

**Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von
Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Physik
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Ing. Natalia Udilova

geb. am 4. Oktober 1969. in Kiev (Ukraine)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Beate Röder
 2. Prof. DDr. Hans Nohl
 3. PD Dr. habil. Ingolf Bernhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1999.

Im Memorium meines Vaters

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Einleitung. | 6 |
| 2 Material und Methoden. | 7 |
| 2.1 Photometrische Analyse. | 7 |
| 2.2 Elektronenspinresonanz. | 7 |
| 2.3 Chemilumineszenz. | 8 |
| 2.4 Dünnschichtchromatographie. | 8 |
| 2.5 Vorbereitung und Untersuchung des biologischen Materials. | 9 |
| 2.5.1 Polymorphkernige Neutrophile (PMN). | 9 |
| 2.5.1.1 Gewinnung der PMN-reichen Leukozyten-Fraktion. | 9 |
| 2.5.1.2 Vitalitätstest | 9 |
| 2.5.1.3 Aktivierung von PMN. | 9 |
| 2.5.1.3.1 Opsonisierung von Zymosan. | 9 |
| 2.5.1.3.2 PMA. | 9 |
| 2.5.1.4 Sauerstoffverbrauch. | 10 |
| 2.5.2 Rattenherz- und Rattenlebermitochondrien (RHM und RLM) | 10 |
| 2.5.2.1 Präparation von RHM und RLM. | 10 |
| 2.5.2.2 Atmungsparameter. | 10 |
| 2.5.2.3 Proteinbestimmung. | 11 |
| 2.5.2.4 Hemmstoffe der mitochondrialen Atmung. | 11 |
| 2.5.2.5 Präparation von submitochondrialen Partikeln (SMP). | 10 |
| 2.6 Chemikalien. | 11 |
| 3 Ergebnisse | 14 |
| 3.1 Xanthin/Xanthinoxidase als Modellsystem für Superoxidbildung. | 14 |
| 3.2 Überprüfung der qualitativen Selektivität einer Nachweismethode. | 15 |
| 3.3 Mögliche Ursachen der quantitativen Störung des Superoxid-Nachweises. | 16 |
| 3.3.1 Spontandismutation. | 16 |
| 3.3.2 Reaktion des Superoxidradikals mit Übergangsmetallen. | 17 |
| 3.4 Photometrische Nachweismethoden von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen. | 19 |
| 3.4.1 Reduktion von Cytochrom c. | 20 |
| 3.4.2 Reduktion von Nitroblau Tetrazolium (NBT). | 25 |
| 3.4.3 Oxidation von Epinephrin. | 28 |
| 3.5 Chemilumineszenz - Methoden zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis im Xanthin/Xanthinoxidase-System. | 32 |
| 3.5.1 Untersuchungen zur Chemilumineszenz des Luminols. | 33 |
| 3.5.2 Chemilumineszenz des Lucigenins. | 38 |
| 3.6 ESR-Spintrapping zum Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale. | 43 |
| 3.6.1 DMPO. | 43 |
| 3.6.2 Phosphoryliertes DMPO. | 46 |
| 3.7 Anwendbarkeit der $O_2^{\cdot-}$ -Detektionsmethoden zum Nachweis von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen in komplexen biologischen Systemen. | 50 |

| | |
|--|-----|
| 3.7.1 Polymorphkernige Neutrophile. | 50 |
| 3.7.1.1 Zunahme des Sauerstoffverbrauchs als Maß der Superoxidbildung. | 51 |
| 3.7.1.2 Anwendung der photometrischen Methoden. | 54 |
| 3.7.1.2.1 Probleme bei der Anwendung des Nitroblau Tetrazoliums zum Superoxidnachweis an stimulierten PMN. | 54 |
| 3.7.1.2.2 Die Reduktion von Cytochrom c durch Superoxidradikale von stimulierten PMN. | 54 |
| 3.7.1.2.3 Anwendung des Epinephrins zum Nachweis der Superoxidradikalbildung an stimulierten PMN. | 59 |
| 3.7.1.3 Chemilumineszenz-Methoden | 62 |
| 3.7.1.3.1 Chemilumineszenz des Lucigenins als Maß der Superoxidbildung an PMN. | 62 |
| 3.7.1.3.2 Luminol-Chemilumineszenz und die Radikalbildung an PMN. | 66 |
| 3.7.1.4 ESR-Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an stimulierten PMN. | 68 |
| 3.7.2 Mitochondrien. | 71 |
| 3.7.2.1 Anwendung von Farbstoffen zum Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an Mitochondrien. | 73 |
| 3.7.2.2 Chemilumineszenz-Untersuchungen der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an Mitochondrien. | 75 |
| 3.7.2.3 Spintrapping-Technik zum Nachweis von $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an Mitochondrien. | 77 |
| 4 Diskussion. | 80 |
| 4.1 Vor- und Nachteile des Xanthin/Xanthinoxidase Systems als $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle. | 80 |
| 4.2 Anwendbarkeit der photometrischen Methoden. | 81 |
| 4.2.1 Cytochrom c. | 83 |
| 4.2.1.1 Qualitative Selektivität. | 83 |
| 4.2.1.2 Quantitative Ausbeute. | 84 |
| 4.2.2 Nitroblau Tetrazolium (NBT). | 85 |
| 4.2.2.1 Qualitative Selektivität. | 85 |
| 4.2.2.2 Quantitative Ausbeute. | 87 |
| 4.2.3 Epinephrin (Adrenalin). | 88 |
| 4.2.3.1 Qualitative Selektivität. | 88 |
| 4.2.3.2 Quantitative Ausbeute. | 89 |
| 4.3 Chemilumineszenz - Methoden. | 91 |
| 4.3.1 Luminol. | 92 |
| 4.3.2 Lucigenin. | 95 |
| 4.4 Spintrapping-Technik im ESR-Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung. | 97 |
| 4.4.1 DMPO und DEPMPO als Spintraps für $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis. | 98 |
| 5 Schlußfolgerung. | 101 |
| 5.1 Qualitative Beurteilung der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweissystemen. | 101 |
| 5.2 Quantitative Beurteilung der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweissystemen. | 101 |
| 6 Literaturliste. | 102 |

Liste der verwendeten Abkürzungen.

| | |
|------------------------|---|
| $^1\text{O}_2$ | Singulett-Sauerstoff |
| AA | Antimycin A |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CL | Chemilumineszenz |
| COMP | Carboxy-O-Methyltransferase |
| DEPMPO | 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide |
| DF | Diformazan |
| DMPO | 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid |
| DMSO | Dimethylsulphoxid |
| DPI | Diphenyliodoniumchlorid |
| DTPA | Diethylentriaminpentaessigsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MF | Monoformazan |
| MPO | Myeloperoxidase |
| NAD(P)H | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat) |
| NBT | Nitroblau Tetrazolium |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| $\text{O}_2^{\cdot -}$ | Superoxidradikal |
| OD | optische Dichte |
| OH^{\cdot} | Hydroxylradikal |
| PBS | "Phosphat Buffer Saline" |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |
| PMN | Polymorphkernige Neutrophile |
| RC | "respiratory control" |
| RHM | Rattenherzmitochondrien |
| RLM | Rattenlebermitochondrien |
| SMP | submitochondriale Partikel |
| SOD | Superoxid Dismutase |
| TRAP | Triethanolamin |
| TTFA | Thenoyltrifluoroacetone |
| X | Xanthin |
| XOD | Xanthinoxidase |

1 Einleitung.

Die beinahe 30 Jahre zurückliegende Erkenntnis, daß bestimmte Stoffwechselvorgänge der Aerobier mit der zwangsweisen Bildung aktivierter Sauerstoffspezies, den sogenannten Sauerstoffradikalen einhergehen, hat zu einem teilweise völlig neuen Verständnis der Pathogenese einer stetig wachsenden Zahl von Erkrankungen geführt. Die mögliche Bedeutung der endogen- oder exogen-induzierten Sauerstoffradikalbildung als Initiator oder Schrittmacher (Promotor) des Alterungsprozesses, der Arteriosklerose, der postischämischen Organschäden, des Diabetes mellitus oder verschiedener neurologischer sowie dermatologischer Erkrankungen ist weltweit Gegenstand von wissenschaftlichen Aktivitäten in allen Teilbereichen der biologischen Forschung. Das Hauptinteresse der Forscher gilt hierbei der quantitativen und qualitativen Analytik der Sauerstoffradikale in biologischen Systemen mit dem Ziel, Ursache der Bildung und Stellenwert in der Pathogenese der jeweiligen Erkrankungsform zu verstehen. Dies ist als Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien erforderlich. Im Vordergrund stehen hierbei die verschiedenen natürlichen und synthetischen Antioxidantien, durch deren Anwendung sowohl Bildung als auch Folgeschäden der Sauerstoffradikale kontrolliert werden können. Da Sauerstoffradikale in wässrigem Milieu instabil sind, ist deren Nachweis in ihrer natürlichen biologischen Umgebung (in situ) äußerst schwierig und unsicher. Durch die direkte Reaktion mit biologischen Komponenten in unmittelbarer Umgebung ihrer Entstehung sinkt die Gleichgewichtskonzentration der Sauerstoffradikale häufig unter ihre Nachweisgrenze. Die phylogenetische Entwicklung der Aerobier war daher zwangsweise mit der Ausstattung von Antioxidantien verbunden, die auf Grund ihrer besonderen Lokalisation und biologischen Eigenschaften die biologische Funktionseinheit durch Eliminierung der Radikale bzw. Verhinderung der durch sie induzierbaren Schäden stabilisiert. Hieraus ergibt sich, daß das „freie Auftreten“ von Sauerstoffradikalen in einem intakten biologischen Organismus kaum meßbar ist. So schätzt man die stationäre Konzentration von Superoxidradikalen in der Zelle auf 10^{-11} M. Für die Analytik der pathophysiologischen Bedeutung der Sauerstoffradikale ergeben sich daher drei Konzepte:

1. Nachweis der Verminderung des biologischen Antioxidantiengehaltes als Folge der vermehrten Sauerstoffradikalbildung
2. Nachweis der durch Sauerstoffradikale direkt oder indirekt verursachten biologischen Schäden
3. Untersuchung der Sauerstoffradikalbildung an in vitro Systemen

Der indirekte Nachweis der Sauerstoffradikalbildung über die Analyse der durch Radikale induzierten Schäden, einschließlich der Abnahme der Antioxidantien, ermöglicht zwar den Nachweis der Existenz des oxidativen Stress-Geschehens (Übergewicht der Sauerstoffradikalbildung über die Aktivität der Schutzmechanismen), gibt aber keine genaue Information über den Bildungsmechanismus, den Bildungsort sowie Art der Sauerstoffradikale im Organismus.

Die Untersuchung von Sauerstoffradikalen in isolierten Systemen, die als potentielle Sauerstoffaktivatoren in Frage kommen (Mitochondrien, Mikrosomen, Xanthinoxidase, Entzündungszellen), ermöglicht hingegen sowohl kausale Einblicke in die Bildung als auch in die Identität und Quantität der Radikalspezies. Dies ist für eine kausale therapeutische Intervention unabdingbar. Andererseits ist es erforderlich, quantitative Analysen einer konstanten Sauerstoffradikalbildungsquelle durchzuführen, um Radikalfängereigenschaften nativer und potentieller Antioxidantien zu untersuchen. Durch Anwesenheit der Antioxidantien in diesen *in vitro* Systemen wird die quantitative Ausbeute des radikalspezifischen Nachweissignals vermindert. Hierdurch lassen sich Aussagen über die Art und Effizienz der Antioxidantien machen.

Obwohl für den direkten Nachweis der Sauerstoffradikalbildung an in vitro Systemen eine Vielzahl verschiedener Methoden beschrieben ist und angewendet wird, gibt es zunehmend Widersprüche, will man Literaturdaten verschiedener Labore miteinander vergleichen. Diese mangelnde Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden ist ein großes Hindernis im Erkenntnisfortschritt der Sauerstoffradikalbiochemie und -Pathologie.

Ausgehend von der Tatsache, daß der Initialschritt, der zum oxidativen Stress führt, stets die univalente Übertragung eines Elektrons auf Sauerstoff ist, konzentriert sich die vorliegende Untersuchung auf die Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen.

Ziel der Untersuchung war eine Bestandsaufnahme der zur Zeit verwendeten Methoden zum Nachweis der Superoxidradikale unter den physiologisch relevanten Bedingungen, sowie deren

qualitative und quantitative Überprüfung im Vergleich und im Bezug auf die jeweiligen biologischen Untersuchungsobjekte.

2 Material und Methoden.

2.1 Photometrische Analyse.

Die Absorptionsmessungen wurden an einem Hitachi U-3300 Spektrophotometer (Japan) in Quarzküvetten ($d = 1\text{cm}$) durchgeführt. Das Gerät ermöglicht das Rühren sowie die Thermostatierung der Proben.

Für die Bestimmung der Aktivität von Xanthinoxidase wurde die Harnsäurebildung über die Zunahme der Absorption bei 290nm verfolgt ($\epsilon_{290\text{nm}} = 12.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Bei dem photometrischen Nachweis der Superoxidbildung im Xanthin/Xanthinoxidase System wurde

die Bildungsgeschwindigkeit des Reaktionproduktes $\frac{dc}{dt}$ aus der Zunahme der optischen Dichte

$\frac{dOD_\lambda}{dt}$ bei der entsprechenden Wellenlänge λ errechnet:

$$OD_\lambda = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c,$$
$$\text{und } \frac{dc}{dt} = \frac{1}{\epsilon_\lambda \cdot l} \cdot \frac{dOD_\lambda}{dt}$$

Gleichung 1

wobei OD_λ - optische Dichte bei der Wellenlänge λ ,

c - Konzentration des Reaktionproduktes,

l - optischer Weg und

ϵ_λ - Extinktionskoeffizient des Reaktionsproduktes bei der Wellenlänge λ sind (für Cytochrom c $\epsilon_{550\text{nm}} = 21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für Formazan $\epsilon_{540\text{nm}} = 7.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für Adrenochrom $\epsilon_{480\text{nm}} = 2.86\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Bei der Auswertung von spektrophotometrischen Messungen, welche in einem Medium mit starker Streuung erfolgten (Zellen, Mitochondrien), wurde die Extinktion bei einer Referenzwellenlänge (585nm) von der Extinktion in dem für den Farbstoff entsprechenden Maximum subtrahiert.

Falls nicht anders angegeben, erfolgten alle spektrophotometrischen Untersuchungen bei 37°C.

2.2 Elektronenspinresonanz (ESR).

Die ESR ist eine Methode zum Nachweis paramagnetischer Spezies. Der Meßprinzip beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie aus einem hochfrequenten elektromagnetischen Feld bei Erfüllung der Resonanzbedingung:

$$\hbar\nu = g\beta H$$

Gleichung 2

wobei \hbar - das Planksche Wirkungsquantum, ν - die Frequenz des elektromagnetischen Feldes, g - der Aufspaltungsfaktor oder einfach g -Faktor, β - das Bohrsche Magneton und H - die magnetische Feldstärke sind. Bei Erfüllung der Resonanzbedingung (Gleichung 2) erfolgen Übergänge der ungepaarten Elektronen zwischen den Energieniveaus. Aus meßtechnischen Gründen wird die Absorption der Mikrowellenenergie meist als erste Ableitung registriert. Das entstandene Spektrum wird im wesentlichen durch den g -Faktor und durch die Hyperfeinaufspaltung bestimmt.

Für ein freies Elektron hat g einen Wert von $g_e = 2,00232$. Im allgemeinen ist der g -Wert von g_e verschieden und hängt von der Orientierung des Moleküls, an dem sich das ungepaarte Elektron

befindet, im äußeren Magnetfeld ab. Für freie Radikale unterscheidet sich der g-Faktor jedoch nur gering von g_e .

Die Hyperfeinaufspaltung reflektiert die Wechselwirkung des Magnetfeldes des ungepaarten Elektrons (Spin) mit dem benachbarten Kernspin (I). Die Anzahl der Spektrumslinien ($2I+1$) und die Aufspaltungskonstanten sind von Kernspin, von der Art sowie von der Position des Kerns in einem Molekül abhängig.

Die ESR-Messungen erfolgten mit einem ER 200 D-SRC 9/SRC Elektronenspinresonanz-Spektrometer der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) bei einer Mikrowellenfrequenz von ca. 9.6 GHz und einer Modulationsfrequenz von 100 kHz. Es wurden Hohlraumresonatoren vom Typ TE102 und TM110 verwendet. Für die Datenerfassung der ESR-Spektren wurde das OS/9-Datensystem ESR 1600 der Firma Bruker verwendet. Die Datenbearbeitung sowie Computersimulationen erfolgten mit dem von Dr. L.Gille geschriebenen Programm ESR-SIMU sowie mit den Programmen „WinEPR SimFonia“ (Version 1.2) und „Win-EPR“ (Version 921201) der Firma Bruker.

Die Messungen wurden entweder bei Raumtemperatur oder bei 37°C durchgeführt.

Für die Thermostatierung der Küvette bei 37°C wurde eine variable Temperatureinheit B-VT1000/ER4111VT eingesetzt, die mit einem Heizelement und mit einem Stickstoffverdampfer arbeitet. Die Temperatur wurde mit einer Thermopaar (Chrom-Aluminium) kontrolliert, wobei die Genauigkeit $\pm 1K$ betrug.

Als interner Standard diente 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl (TEMPO, $g = 2.0055$).

Alle Messungen erfolgten grundsätzlich in sogenannten Flachzellen, d.h. Quarzküvetten von extrem geringer Dicke (0.2-0.3 mm) und einer Breite von entweder 8mm (TE102) oder 15mm (TM110), um dielektrische Verluste durch das stark polare Medium Wasser zu minimieren.

2.3 Chemilumineszenz.

Die Lichtemission wurde mit einem rotempfindlichen Photomultiplier, Modell EMI 9658 AM, der Firma Thorn EMI Electron Tubes Inc. (Fairfield, NJ/USA) nachgewiesen. Zur Reduktion des Grundrauschens bis auf ca. 250cps wurde der Photomultiplier auf -25°C gekühlt. Die Empfindlichkeit des Photomultipliers wurde mit 213.7 $\mu A/lum$ angegeben; die Quanteneffizienz wies eine breite Verteilung in sichtbaren Bereich mit einem Maximum von 18.3% bei 440nm auf. Die Hochspannung von 1325V wurde zur Versorgung des Photomultipliers angelegt. Die zeitlichen Charakteristiken des Photomultipliers sind: Anstiegszeit $t_r=10ns$, Durchgangszeit $t_f=65ns$, Vollbreite am Halbmaximum $t_{v_{bhm}}=22ns$.

Die Verstärkung des Ausgangssignals erfolgte mit einem Diskriminator/Verstärkersystem (Modell 1121) der Firma Princeton Applied Research (Princeton, NJ/USA), das mit einem Adapter (Modell 1109) für Einzelphotonenzählung versehen war. Die Erfassung von Meßdaten erfolgte mit dem Programm Turbo-MCS A67-BI von EG&G ORTEG (Tennessee/USA), wobei die Integrationszeit der Photonenzählung auf 1s eingestellt wurde. Die Ausstattung der Meßzelle mit einem Wasserthermostat ermöglichte, die Chemilumineszenz-Messungen entweder bei Raumtemperatur oder bei 37°C durchzuführen.

2.4 Dünnschichtchromatographie.

Zur Trennung der Reduktionsprodukte von Nitroblau Tetrazolium wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die zu untersuchende Mischung wurde auf die Kieselgel-beschichteten Glasplatten (Kieselgel 60 DC-Platten, Merck) aufgetragen und in eine vertikale Trennkammer gebracht. Die Trennung erfolgte mit dem Laufmittel Butanol:Essigsäure:Wasser=80:20:20 (v/v). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Dünnschichtchromatographiescanner „TLC Scanner 3 1.12.00“ und der Software „Cats 4.03“ Firma CAMAG (Muttens, Schweiz). Als Maß der Wanderungsgeschwindigkeit einer Verbindung diente der R_f -Wert:

$$R_f = \frac{\text{Entfernung der Substanz von Start}}{\text{Entfernung der Laufmittelfront von Start}}$$

2.5 Vorbereitung und Untersuchung des biologischen Materials.

2.5.1 Polymorphkernige Neutrophile (PMN).

2.5.1.1 Gewinnung der PMN-reichen Leukozyten-Fraktion.

Polymorphkernige Neutrophile wurden aus Schweineblut isoliert. Für die Sedimentation der Erythrozyten wurden 30ml Citrat-Blut (20mM Natriumcitrat) mit 5ml 6% iger (Gewicht/Volumen) Dextran-Lösung (MW 70 000) vermischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das an Leukozyten reiche Plasma wurde abgenommen und bei 200g 10 min zentrifugiert ($T=4^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2ml Phosphatpuffer (PBS) durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert.

Zur hypotonischen Lysis der restlichen Erythrozyten wurden 10 ml des kalten Phosphat-Puffers (10mM P.i., $\text{pH}=7.4$) zugegeben. Nach 20 s Inkubationszeit wurde die Osmolarität durch die Zugabe von 5 ml einer 2.7%igen NaCl-Lösung in 10 mM Phosphat-Puffer ($\text{pH}=7.4$) wiederhergestellt.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (5min, 200g), anschließend in 5ml PBS resuspendiert und maximal 6 Stunden bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

Um die vorzeitige Aktivierung von PMN zu vermeiden, wurden sie ausschließlich in Plastikgefäßen aufbewahrt.

2.5.1.2 Vitalitätstest

Nach der Isolierung wurde die Vitalität der Zellen über die Färbung mit Trypanblau überprüft. Da die intakten Zellen diesen Farbstoff ausschließen, kann man deren Anteil in jeder Präparation mikroskopisch bestimmen.

Trypanblau wurde in 0.1%-iger Konzentration in PBS gelöst. 200µl frisch isolierter PMN wurden mit 10µl dieser Lösung 5min inkubiert und anschließend mikroskopiert. Alle weiteren Versuche wurden an solchen Präparationen durchgeführt, in denen der Anteil intakter Zellen über 95% betrug.

2.5.1.3 Aktivierung von PMN.

Zur Aktivierung der NADPH-Oxidase an PMN wurden entweder opsoniertes Zymosan oder Phorbolmyristatacetat (PMA) eingesetzt. Alle Messungen der Radikalbildung durch PMN erfolgten bei 37°C . Die Zellen wurden 5min bei dieser Meßtemperatur in PBS mit 5mM Glucose in Anwesenheit der Nachweissubstanz äquilibriert, danach wurden 10µl der 100mM CaCl_2 - und 10µl der 50mM MgCl_2 - Lösungen zu 1ml PBS zugegeben, so daß die Endkonzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} 1mM bzw. 0.5mM betrug. Um die Chelatierung der für die Aktivierung erforderlichen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu vermeiden, wurde zum Meßpuffer kein DTPA zugesetzt.

2.5.1.3.1 Opsonisierung von Zymosan.

Die Opsonisierung des Zymosans wurde, wie in [5] beschrieben, durchgeführt. Zymosan A, eine Präparation aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, wurde in physiologischer Kochsalzlösung (0.85% V/V) suspendiert, so daß die Konzentration 250mg/dl betrug. Die Suspension wurde auf einem kochenden Wasserbad 20 min lang erwärmt und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach einem 10 minütigen Zentrifugieren bei 300g wurde der Supernatant verworfen und das Pellet in 200ml frisch gefrorenem und kurz vorher aufgetautem Plasma resuspendiert. Nach 20 min Inkubation unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension noch einmal - wie oben beschrieben - zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Plasma (200 ml) suspendiert, nachdem die Inkubations- und Zentrifugationsschritte wiederholt wurden. Danach wurde die Suspension zweimal mit 500ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Der Supernatant wurde verworfen. Das opsonisierte Zymosan wurde auf die ursprüngliche Konzentration verdünnt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Die auf diese Weise hergestellte Suspension enthält 600 ± 200 Zymosanpartikeln pro Mikroliter. Für die Stimulierung wurden 10µl Zymosan zu 1ml Probe zugesetzt.

2.5.1.3.2 PMA.

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, Sigma) wurde in Dimethylsulphoxid (DMSO) in einer

Konzentration von 1mg/ml gelöst. Diese Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt und mehrfach aufgetaut und eingefroren. Die Arbeitslösung in der Konzentration 8µg/ml wurde täglich aus der Stammlösung frisch vorbereitet. Dafür wurden 8µl der Stammlösung zuerst mit 92µl DMSO und anschließend mit 900µl bidestilliertem H₂O verdünnt. Für die Stimulierung wurde 10µl der Arbeitslösung pro 1ml Probe zugesetzt, so daß die Endkonzentration 80ng/ml betrug.

2.5.1.4 Sauerstoffverbrauch.

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode MI-730 der Firma Microelectrodes Inc. (Londonderry/USA), gemessen. Das Meßprinzip beruht darauf, daß Sauerstoff auf der Elektrode reduziert wird, wobei der entstehende Diffusionsstrom der O₂-Konzentration proportional ist.

Die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode erfolgte anhand einer mit Luftsauerstoff gesättigten wässrigen Meßlösung, deren Sauerstoffgehalt 240µM bei 20°C bzw. 212µM bei 37°C beträgt. Durch Zugabe von Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) erfolgt eine 100% ige Reduktion des gelösten Sauerstoffes, so daß der Nullpunkt des Meßbereiches erreicht wird. Die Berechnung des absoluten Sauerstoffverbrauchs wurde unter der Annahme der linearen Abhängigkeit des Elektrodenpotentials von der Sauerstoffkonzentration durchgeführt.

Die Messungen an den stimulierten Zellen erfolgten in einer thermostatisierten Küvette, wobei die Temperatur auf 37°C eingestellt war.

2.5.2 Rattenherz- und Rattenlebermitochondrien (RHM und RLM)

2.5.2.1 Präparation von RHM und RLM.

Die Isolierung von Rattenherz- bzw. Rattenlebermitochondrien erfolgte nach der Methode von Szarkowska und Klingenberg [136].

Die entnommenen Rattenherzen bzw. Rattenlebern wurden zweimal mit Präparationspuffer aus 0.3M oder 0.25M Sucrose für RHM bzw. RLM, 20mM Triethanolamin (TRAP) und 1mM EDTA gewaschen. Nach der Zerkleinerung und Homogenisierung erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 2500 U/min (570g) und 4°C. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand wurde 10min bei 9000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet (Mitochondrien) wurde im Präparationspuffer suspendiert und erneut 10min bei 9000U/min und 4°C abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt, und die Mitochondrien anschließend im Präparationspuffer (300µl für RHM bzw. in 500-1000µl für RLM) resuspendiert. Der Proteingehalt der Mitochondrien-Suspension wurde wie in Kapitel 0 beschrieben bestimmt. Die Mitochondrien wurden bis zur Messung maximal 8 Stunden auf Eis aufbewahrt.

Für die Messungen wurde der Präparationspuffer mit 500mg/l fettsäurefreiem Albumin (BSA, Firma „Sigma“) versetzt.

2.5.2.2 Präparation von submitochondrialen Partikeln (SMP).

Herzmitochondrien (6 Ratten) wurden wie oben beschrieben isoliert, nur daß der Präparationspuffer eine andere Zusammensetzung aufweist: 0.25M Sucrose, 50mM HEPES, pH=7.5. Die präparierten Mitochondrien wurden in 5ml einer Lösung mit 0.25M Sucrose, 50mM HEPES, 2mM EDTA (pH=9.0) suspendiert und 8mal für 5s mit Ultraschall behandelt (40 W). Zwischen den Beschallungen wurde die Suspension ca.30s im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurde die behandelte Suspension 10min bei 8200upm (Rotor SS-34) zentrifugiert. Der die SMP enthaltende Überstand wurde abgenommen und 30min bei 32000upm (Rotor SW50L) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet (SMP) wurde in 500µl des Meßpuffers (0.25M Sucrose, 50mM HEPES, 0.5mM EDTA, pH=7.5) resuspendiert und der Proteingehalt, wie in Kapitel 0 beschrieben, bestimmt.

2.5.2.3 Atmungsparameter.

Zur Qualitätskontrolle der isolierten Mitochondrien wurden die Effizienz der Phosphorylierung (P/O) sowie die Atmungskontrollwerte RC („respiratory control“) bestimmt. Dies erfolgte mit einer Clark-Sauerstoffelektrode bei 25°C in dem mit BSA versetzten Präparationspuffer. Die Konzentration der

Mitochondrien betrug 0.5mg Protein/ml. Die Effizienz der Phosphorylierung, die sogenannte Kopplungskonstante, wurde über das Verhältnis zwischen den molaren Äquivalenten des Phosphates (P) und des verbrauchten Sauerstoffes (O) unter dem Atmungszustand 3 bestimmt. Die RC-Werte wurden aus dem Verhältnis des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit und ohne ADP+Phosphat berechnet.

2.5.2.4 Proteinbestimmung.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der modifizierten Biuret-Methode [23]. Das Prinzip dieses Verfahrens ist die Bildung eines Farbkomplexes des Kupferreagenz mit Peptidbindungen, dessen Intensität photometrisch gemessen werden kann. Die Extinktion des Farbkomplexes ist der Konzentration über einen relativ großen Bereich proportional.

Eine Fällung des Proteins wurde stets vor der Messung durchgeführt. Hierfür wurden 10µl Probe (Mitochondrien/SMP) zu 1ml Milli-Q-Wasser pipettiert und 200µl 3M Trichloressigsäure zugegeben. Nach Schütteln wurde die Probe 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei 2500g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in 2.5 ml der Biuret-Reagenzlösung (0.2N NaOH; 3g/l CuSO₄·5H₂O; 9g/l Na-K-Tartrat-Tetrahydrat NaKC₄H₄O₆·4H₂O; 5g/l KJ) aufgelöst. Nach 10 Minuten Reaktionszeit wurde die optische Dichte A₁ bei 546 nm gemessen. Eine kleine Menge (Spatelspitze) KCN wurde in die Küvette gegeben; nach Entfärbung der Lösung wurde die optische Dichte A₂ gemessen und ΔA=A₁-A₂ berechnet. Der Blindwert ΔA₀ wurde mit Wasser statt der Probe erhalten.

Die Berechnung der Proteinkonzentration C erfolgte nach der Formel:

$$C = \frac{\Delta A - \Delta A_0}{\epsilon \cdot d} \cdot \alpha,$$

wobei α- Verdünnungsfaktor (µl Gesamtvolumen/µl Probevolumen), d- Schichtdicke der Küvette und ε- Extinktionskoeffizient ε=0.2243 mg⁻¹ ml cm⁻¹ sind. Der Extinktionskoeffizient wurde aus der Eichkurve mit dem fettsäurefreien BSA (Fraktion V, ≥96% Proteingehalt) ermittelt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Mitochondrien/SMP bei Experimenten auf die Konzentration von 0.5mg Protein/ml verdünnt.

2.5.2.5 Hemmstoffe der mitochondrialen Atmung.

Zur Induktion der Radikalbildung wurden Mitochondrien/SMP (0.5mg Protein/ml) in dem entsprechenden Meßpuffer (0.3M bzw. 0.25M Sucrose, 20mM TRAP, 1mM EDTA, 0.5mg/ml Albumin) mit Succinat versetzt (Endkonzentration 10mM) und der in Acetonitril gelöste Hemmstoff Antimycin A zugegeben, so daß seine Endkonzentration 2µg/ml betrug. Weitere Hemmstoffe der mitochondrialen Atmung wie Myxothiazol und Rotenon wurden ebenfalls in Acetonitril gelöst und zu der mitochondrialen Suspension zugegeben (Konzentration 2µg/ml im Test). Die Konzentrationen von TTFA (Thenoyltrifluoroacetat) und Kaliumcyanid (in DMSO bzw. in H₂O gelöst) betrugen 1mM im Test.

Für die ESR-Experimente wurden höhere Konzentrationen von Mitochondrien verwendet und die Konzentration der Hemmstoffe entsprechend erhöht, so daß das Verhältnis Hemmstoff/mg Protein konstant blieb.

In allen Experimenten an Mitochondrien war der Volumenanteil von dem mit Hemmstoff zugegebenen Lösungsmittel ≤0.5% und hatte keine Auswirkung auf die Atmungsparameter.

2.6 Chemikalien.

Käuflich erworben wurden die folgenden in der Arbeit verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien:

| | | |
|---|-------------|-------|
| 1-Butanol | zur Analyse | Merck |
| 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl (TEMPO) | 95-98% | Sigma |
| 2,4-Dinitrophenol (90-95%) | | Sigma |
| 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO) | | Sigma |

| | | |
|--|-------------------|---------------------|
| 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedion; (Luminol) | 95-97% | Sigma |
| Acetonitril | zur Analyse | Merck |
| Adenosin-5'-diphosphat Monokaliumsalz; ADP | | Boehringer Mannheim |
| Adrenochrom | | Sigma |
| Aktivkohle | reinst | Merck |
| Antimycin A | | Boehringer Mannheim |
| Bernsteinsäure Dinatriumsalz; Succinat | zur Synthese | Merck |
| Bis-N-Methylacridinium (Lucigenin) | | Sigma |
| Calciumchlorid-Dihydrat | | Merck |
| Cytochrom c | | Sigma |
| Cytochrom c, teilweise acetyliert | | Sigma |
| D(+)-Glucose-Monohydrat | f.biochem. Zwecke | Merck |
| Dextran (MW ca. 69000) | med. rein | Sigma |
| Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) | zur Analyse | Merck |
| Dimethylsulphoxid (DMSO) | zur Analyse | Merck |
| Dinatriumhydrogenphosphat | zur Analyse | Merck |
| Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) (>98%) | | Sigma |
| Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat | zur Analyse | Merck |
| Epinephrinhydrogentartrat | | Sigma |
| Essigsäure (98-100 %) | zur Analyse | Merck |
| Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA) | zur Analyse | Merck |
| Harnsäure, Natriumsalz | | Sigma |
| Kaliumcyanid | zur Analyse | Merck |
| Kaliumhydrogenphosphat | zur Analyse | Merck |
| Kaliumjodid | zur Analyse | Merck |
| Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat | zur Analyse | Merck |
| Katalase EC 1.11.1.6; (Pulver) | | Sigma |
| Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat | zur Analyse | Merck |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | zur Analyse | Merck |
| Myxothiazol | | Boehringer Mannheim |
| Natriumchlorid | zur Analyse | Merck |
| Natriumdithionit | | Merck |
| Natriumhydroxid | zur Analyse | Merck |
| Nitroblau Tetrazolium (NBT) | Grade III | Sigma |

| | | |
|--|-------------------|-------|
| Phorbolmyristatacetat (PMA) | >99% | Sigma |
| Rinderserumalbumin, fettsäurefrei (FraktionV) | | Sigma |
| Rotenon | | Sigma |
| Sucrose | f.d.Mikrobiologie | Merck |
| Superoxid Dismutase (SOD), EC 1.15.1.1 | | Sigma |
| Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) | | Sigma |
| tri-Natriumcitrat-2-Hydrat | zur Analyse | Merck |
| Trichloressigsäure | zur Analyse | Merck |
| Triethanolaminhydrochlorid (TRAP) | zur Analyse | Fluka |
| Trypanblau | f.d. Mikroskopie | Merck |
| Uricase (Uratoxidase); EC 1.7.3.3 | | Sigma |
| Wasserstoffperoxid 30% | med. rein | Merck |
| Xanthin, Natriumsalz | Grad III | Sigma |
| Xanthinoxidase (XOD), EC 1.2.3.2 | Grad I | Sigma |
| Zymosan A (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | | Sigma |

Reduziertes Cytochrom c wurde durch die Reaktion des oxidierten Cytochrom c mit Natriumdithionit erzeugt. Zur wässrigen Lösung des Cytochroms c (10-20mg/ml) wurde eine Spatelspitze des Natriumdithionites ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zugegeben, 1-2 min inkubiert und mit einer Entsalzungssäule Sephadex G-25 vom Überschuß des Dithionites abgetrennt. Die Endkonzentration des reduzierten Cytochrom c wurde spektrophotometrisch bestimmt ($\epsilon=21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Phosphoryliertes DMPO (DEPMPO) wurde freundlicherweise von Prof. A.Tomasi (Modena, Italien) zur Verfügung gestellt.

DMPO sowie phosphoryliertes DMPO wurden unmittelbar vor der Anwendung mit Aktivkohle gereinigt. Dafür wurde zu ca. 1ml wässriger Lösung des Spintraps (0.5-1M Konzentration) eine Spatelspitze Aktivkohle zugesetzt und 10 min mit Ultraschall im Wasserbad bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde die Aktivkohle durch 5min Zentrifugieren bei 200g sedimentiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Konzentration des Spintraps spektrophotometrisch unter Verwendung der folgenden Extinktionskoeffizienten bestimmt:

für DEPMPO $\epsilon_{240\text{nm}} = 6900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Methanol) [49];

für DMPO $\epsilon_{228\text{nm}} = 7800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wasser) [49].

3 Ergebnisse

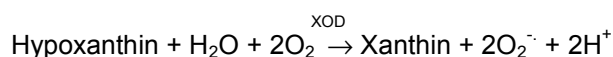
3.1 Xanthin/Xanthinoxidase als Modellsystem für Superoxidbildung.

Um die verschiedenen Detektionssysteme hinsichtlich ihrer Selektivität und quantitativen Ausbeute vergleichbar zu machen, war es erforderlich, eine geeignete $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildungsquelle zu finden.

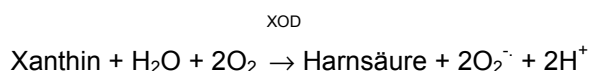
Als potentielle Superoxidradikal-Bildner ist eine Gruppe von Enzymen anzusehen, die auf Sauerstoff Elektronen übertragen (Oxidasen). Diese Klasse von Enzymen katalysiert die Übertragung eines Einzelektrons auf das O_2 -Molekül, wodurch eine Spinumkehr umgangen werden kann.

Eine für die Superoxid-Bildung in biologischen Systemen wichtige Oxidase ist die Xanthinoxidase (XOD). *In vivo* wird Xanthinoxidase vermehrt durch die Oxidation von SH-Gruppen aus Xanthindehydrogenase gebildet. Endothelzellen aller Gefäße besitzen eine hohe Xanthinoxidase-Aktivität. Nach Ischämie (Mangelversorgung mit Sauerstoff) und anschließender Reoxygenierung beobachtet man eine starke Zunahme der Xanthinoxidase-Aktivität durch die Umwandlung aus Xanthindehydrogenase.

Xanthinoxidase ist ein Eisen-Molibdän Flavoprotein, das FAD enthält. Sie katalysiert die Oxidation von Xanthin bzw. Hypoxanthin, wobei jeweils zwei Einzelektronen auf Sauerstoff übertragen werden und Harnsäure als Oxidationsprodukt gebildet wird:



Reaktion 1



Reaktion 2

Xanthinoxidase ist nicht besonders substratspezifisch; außer Hypoxanthin und Xanthin können auch verschiedene Purine und Pterine sowie Aldehyde als Substrate dienen. Mit Xanthin als Substrat beträgt die Michaelis-Menten Konstante $K_M = 1.7 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (pH=7.4, Phosphat-Puffer, 25°C) [1].

In der vorliegenden Arbeit wurde der enzymatische Umsatz des Xanthins zur Harnsäure spektrophotometrisch verfolgt. Die Harnsäurebildungsrate wurde über die Zunahme der optischen Dichte bei 290nm unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{290\text{nm}} = 12.6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

berechnet. Aus der Reaktionsgleichung (Reaktion 2) kann die theoretische $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate $\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt}$

ermittelt werden, wenn die Bildungsrate von Harnsäure $\frac{d[\text{HS}]}{dt}$ bekannt ist und die 2:1 Superoxid : Harnsäure Stöchiometrie berücksichtigt wird:

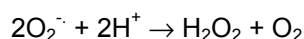
$$\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt} = 2 \frac{d[\text{HS}]}{dt},$$

Gleichung 3

worin $[O_2^{\cdot-}]$ und $[\text{HS}]$ die Konzentrationen der Superoxidradikale bzw. der Harnsäure bezeichnen.

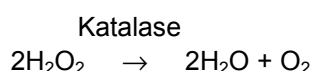
Diese Gleichung wurde unter der Annahme ausgestellt, daß Sauerstoff durch Xanthinoxidase ausschließlich zum Superoxid reduziert wird.

In wässrigem Medium bei physiologischen pH-Werten sind die produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Radikale instabil und dismutieren, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die Dismutationsreaktion wird detailliert in Kapitel 0 betrachtet, die Reaktion kann jedoch allgemein wie folgt geschrieben werden:



Reaktion 3

Das gebildete Wasserstoffperoxid kann die enzymatische Bildung der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale beeinflussen. Es gibt Hinweise, daß Wasserstoffperoxid die Aktivität der Xanthinoxidase hemmt [79]. Zudem fördert Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Übergangsmetallen die Bildung von hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen, die mit Xanthinoxidase reagieren und dabei ihre Struktur sowie ihre Aktivität verändern können. Um diese Einflüsse auszuschließen, wurde das H_2O_2 -eliminierende Enzym Katalase zu der Reaktionsmischung zugesetzt. Die Eliminierung von H_2O_2 durch Katalase erfolgt gemäß Reaktion 4 :



Reaktion 4

Die Ergebnisse der Überprüfung, ob eine Hemmung der Xanthinoxidase-Aktivität durch H_2O_2 bei den ausgewählten Substrat/Enzym-Konzentrationen stattfindet, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Einfluß der Katalase auf die Aktivität der Xanthinoxidase.

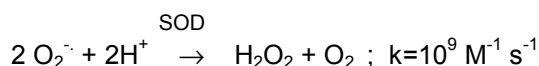
| System | Harnsäurebildung, $\mu\text{M}/\text{min}$ |
|---------------------|--|
| X/XOD ohne Katalase | 5,89±0,68 (n=2) |
| X/XOD mit Katalase | 5,68±0,70 (n=2) |

Da keine signifikante Veränderung der Harnsäurebildung in Anwesenheit von Katalase beobachtet wurde, kann geschlossen werden, daß die Aktivität der Xanthinoxidase durch die gebildete Menge von Wasserstoffperoxid bei den gewählten Konzentrationen von Substrat und Enzym nicht beeinflusst wird.

Zu den Vorteilen des Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystems für die Superoxidbildung gehört, daß die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate über einen längeren Zeitraum (ca. 5 Min.) konstant bleibt und je nach dem Substrat/Enzym-Verhältnis auf einen beliebigen, biologisch relevanten Wert einstellbar ist. In der vorliegenden Untersuchung wurde dieses Verhältnis so gewählt, daß die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten den vermuteten Raten *in vivo* entsprechen. Die in den Experimenten verwendete Konzentration des Xanthins war mit $100\mu\text{M}$ so gewählt, daß es als Substrat im Überschuß vorliegt und die gewünschte $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate durch Variation des Xanthinoxidase-Gehaltes eingestellt wurde.

3.2 Überprüfung der qualitativen Selektivität einer Nachweismethode.

Um sicherzustellen, daß die Bildung eines Nachweisproduktes ausschließlich durch eine Interaktion mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen zustande gekommen ist, wurden die jeweiligen Nachweisreaktionen in Ab- und Anwesenheit des Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD) durchgeführt. SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidradikalen, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit diffusionslimitiert ist:



Reaktion 5

Die Eliminationsrate der durch SOD-katalysierten $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Dismutation muß deutlich höher sein als die Reaktionsgeschwindigkeit der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale mit dem Nachweissystem. Ist diese Bedingung erfüllt, was meistens der Fall ist, dann ist davon auszugehen, daß die Bildung des Nachweisproduktes in Anwesenheit der SOD zu 100% gehemmt wird. Mit Hilfe der SOD ist somit eine Überprüfung der Selektivität der angewandten Nachweismethode für $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale möglich.

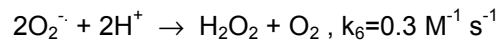
Der topographische Aufbau mancher biologischer Funktionseinheiten, in denen eine $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle vermutet wird, versperrt dem großmolekularen SOD-Enzym jedoch häufig den Zugang (z.B. Mitochondrien). Dies kann die Identifizierung der Spezies, die für eine mögliche Reaktion mit dem Nachweissystem verantwortlich sind, erschweren.

3.3 Mögliche Ursachen der quantitativen Störung des Superoxid-Nachweises.

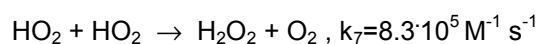
Wenn der Superoxid-Nachweis potentieller biologischer Bildungsquellen untersucht werden soll, ist mit verschiedenen Nebenreaktionen zu rechnen, welche das Nachweissystem quantitativ oder qualitativ verfälschen können.

3.3.1 Spontandismutation.

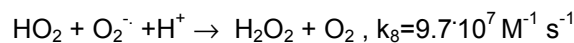
Eine quantitative Verfälschung des $O_2^{\cdot-}$ -Radikalnachweises kann durch Spontandismutation der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale auftreten. Der pK-Wert für $O_2^{\cdot-}$ -Radikale liegt bei 4.8, so daß die Dismutation pH-Wert-abhängig abläuft. Sie kann mit den zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis eingesetzten Substanzen konkurrieren und dadurch die nachweisbare $O_2^{\cdot-}$ -Menge vermindern. Der Anteil der protonierten $O_2^{\cdot-}$ -Radikale ist hierbei zu berücksichtigen, weil die Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Dismutationsreaktionen unterschiedlich sind:



Reaktion 6



Reaktion 7



Reaktion 8

Bei dem physiologisch relevanten pH-Wert 7.4, bei dem die Nachweissysteme getestet wurden, liegt der größte Teil der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale als Anionradikal vor. Das errechnete Verhältnis $[HO_2]/[O_2^{\cdot-}]$ liegt bei 1/400. Die hierbei zu erwartenden $O_2^{\cdot-}$ -Disproportionsraten ergeben sich aus den oben aufgelisteten Reaktionsgleichungen:

$$\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt} = -0.3[O_2^{\cdot-}]^2$$

Gleichung 4

$$\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt} = -8.3 \cdot 10^5 \cdot [HO_2]^2 \approx -5 \cdot [O_2^{\cdot-}]^2$$

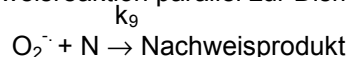
Gleichung 5

$$\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt} = -9.7 \cdot 10^7 \cdot [HO_2] \cdot [O_2^{\cdot-}] \approx -2.5 \cdot 10^5 \cdot [O_2^{\cdot-}]^2$$

Gleichung 6

Hieraus ergibt sich, daß die spontane Superoxid-Dismutation bei physiologischem pH - Wert hauptsächlich über die Reaktion 8 gemäß Gleichung 6 abläuft.

Beim $O_2^{\cdot-}$ - Nachweis läuft eine Nachweisreaktion parallel zur Dismutation ab:



Reaktion 9

Der Anteil α spontan dismutierter und deswegen über die Reaktion 9 nicht erfaßter $O_2^{\cdot-}$ -Radikale wird als Verhältnis der Geschwindigkeiten von Reaktion 8 und Reaktion 9 berechnet:

$$\alpha = \frac{v_8}{v_9} = \frac{k_8 [O_2^{\cdot-}]^2}{k_9 [O_2^{\cdot-}] [N]} = \frac{k_8 [O_2^{\cdot-}]}{k_9 [N]}$$

Gleichung 7

wobei [N] - die Konzentration der Nachweissubstanz ist.

Die obere Grenze der Konzentration von Superoxidradikalen $[O_2^{\cdot-}]$ kann mit der Gleichgewichtskonzentration $[O_2^{\cdot-}]_{ss}$ eingeschätzt werden, welche in einem System aus $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle (Bildungsgeschwindigkeit v) zustande kommt, wenn Superoxidradikale über die spontane Dismutation verschwinden:

$$[O_2^{\cdot-}]_{ss} = \sqrt{\frac{v}{k_8}}$$

Gleichung 8

Somit ergibt sich der Anteil nicht erfaßter $O_2^{\cdot-}$ -Radikale als:

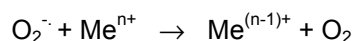
$$\alpha \leq \frac{k_8 [O_2^{\cdot-}]_{ss}}{k_9 [N]} = \frac{k_8}{k_9 [N]} \sqrt{\frac{v}{k_8}} = \frac{\sqrt{vk_8}}{k_9 [N]}$$

Gleichung 9

Die Geschwindigkeit, mit der Superoxidradikale dismutieren, stellt bestimmte Anforderungen an die Geschwindigkeit der Reaktion 9, wenn eine Methode den Anspruch auf quantitativen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis erhebt. Wenn der Anteil dismutierter $O_2^{\cdot-}$ -Radikale vernachlässigbar gering sein soll im Vergleich zu denen, die mit der Nachweissubstanz reagieren, muß die Nachweisreaktion schneller als die Dismutation ablaufen ($\alpha \ll 1$).

3.3.2 Reaktion des Superoxidradikals mit Übergangsmetallen.

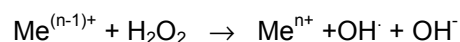
Spurenmengen an Übergangsmetallen in der Probe können die stationäre Konzentration von Superoxidradikalen durch Katalyse einer Reaktion vom Fenton-Typ wesentlich erniedrigen. Hierbei reagiert das $O_2^{\cdot-}$ -Radikal mit Metallen veränderlicher Wertigkeit nach Reaktion 10:



Reaktion 10

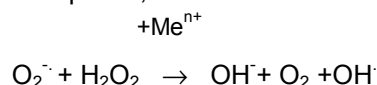
wo Me^{n+} für z.B. Fe^{3+} , Cu^{2+} oder Mn^{3+} steht.

Das Wasserstoffperoxid ist als Dismutationsprodukt von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen in protischem Medium stets vorhanden und kann Übergangsmetalle von der reduzierten Form auf die nächste Oxidationsstufe oxidieren. Bei dieser Reaktion entstehen hochreaktive Hydroxylradikale (Reaktion 11), die das biologische Untersuchungsmaterial oxidativ zerstören sowie den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis beeinflussen können.



Reaktion 11

Da die Übergangsmetalle durch die Redoxzyklierung (Reaktion 10 und Reaktion 11) nicht verbraucht werden und nur eine katalytische Rolle spielen, kann die Gesamtreaktion wie folgt beschrieben werden:



Reaktion 12

Die Anwendung von Metall-Chelatoren kann diese Reaktion nicht immer sicher verhindern, da

komplexiertes Eisen, z.B. mit EDTA, die Hydroxyl-Radikalbildung sogar noch deutlich beschleunigen kann [56-58,83].

Die Pufferreagenzien, z.B. Phosphat-Salze, enthalten vor allem Eisen und andere Übergangsmetalle als Verunreinigungen. Um deren möglichen Einfluß auf den Superoxidnachweis auszuschließen, wurde Eisen durch jeweils 1mM DTPA im Puffer komplexiert und so aus der Reaktionen herausgehalten.

3.4 Photometrische Nachweismethoden von $O_2^{\cdot-}$ -Radikale.

Photometrische Methoden zum Nachweis der Superoxidbildung in biologischen Systemen werden am häufigsten verwendet.

Da Superoxidradikale im UV-Bereich absorbieren ($\epsilon_{240nm}=2343 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH=7.5 [20]), ist ein direkter spektrophotometrischer Nachweis theoretisch möglich. Praktisch wird jedoch der direkte Nachweis durch den niedrigen Extinktionskoeffizienten sowie durch die starke UV-Absorption anderer organischer Verbindungen erschwert, so daß diese Methode für biochemische bzw. biologische Fragestellungen nicht anwendbar ist [20]. Aus diesen Gründen werden Superoxidradikale indirekt über chemische Reaktionen mit verschiedenen Farbstoffen nachgewiesen.

Das Meßprinzip der Methoden beruht darauf, daß die verwendeten Indikator-Substanzen durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale oxidiert oder reduziert werden, wobei ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Dieses Reaktionsprodukt wird spektrophotometrisch erfaßt. Die am häufigsten für den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis verwendeten Farbstoffe sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2. Farbstoffe für den photometrischen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis.

| Farbstoff | Gesamtreaktion | ϵ_λ |
|-----------------------------|--|---|
| Cytochrom c | $\text{Cyt.c-Fe}^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Cyt.c-Fe}^{2+} + O_2$ | $\epsilon_{550nm}=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |
| Acetyliertes Cytochrom c | $\text{Ac-Cyt.c-Fe}^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Ac-Cyt.c-Fe}^{2+} + O_2$ | $\epsilon_{550nm}=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |
| Nitroblau Tetrazolium (NBT) | $2\text{NBT}^{2+} + 2O_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Formazan}$ | $\epsilon_{540nm}=7.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |
| Epinephrine (Adrenalin) | $\text{Adrenalin} + 4O_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Adrenochrom} + 4H_2O_2$ | $\epsilon_{480nm}=2.86 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |

In diesem Kapitel werden die verschiedenen photometrischen Methoden für den qualitativen und quantitativen Superoxidnachweis eingesetzt. Als reproduzierbare Superoxidbildungsquelle diente die enzymatische Oxidation des Xanthins durch Xanthinoxidase, wobei die produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate jedes mal über die Harnsäurebildung quantifiziert wurde (Gleichung 3).

Die Farbstoffe wurden in Kontakt mit einer vorher quantifizierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle gebracht. Beim Nachweis reagieren sie mit Superoxidradikalen und die Reaktionsprodukte werden

spektrophotometrisch erfaßt. Aus der Veränderung der optischen Dichte $\frac{dA_\lambda}{dt}$, die durch eine $O_2^{\cdot-}$ -

abhängige Bildung des bei der Wellenlänge λ absorbierenden Reaktionsproduktes zustande kommt, läßt sich bei Kenntnis des jeweiligen Extinktionskoeffizienten die Bildungsrate dieses

Reaktionsproduktes $\frac{dc}{dt}$ verfolgen (Kapitel 2.1, Gleichung 1).

Die nachgewiesene Superoxid-Bildungsrate $\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt}$ wurde aus der Bildungsrate des

Reaktionsproduktes $\frac{dc}{dt}$ unter Berücksichtigung der formellen Stöchiometrie (Tabelle 2) von

Superoxid/Reaktionsprodukt für den jeweiligen Farbstoff errechnet:

$$\frac{d[O_2^{\cdot-}]}{dt} = n \cdot \frac{dc}{dt}$$

Gleichung 10

(n - Anzahl der Superoxidmoleküle, die zur Bildung eines Moleküls des Reaktionsproduktes notwendig sind).

Weiter wird die nach Gleichung 10 berechnete nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate auch als die $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate bezeichnet.

Wird die im Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate variiert, so sollte sich die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate ($O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate) ebenfalls dementsprechend ändern. Die Abhängigkeit der nachgewiesenen von der produzierten Superoxidbildungsrate wird in diesem Kapitel für jeden Farbstoff aufgenommen.

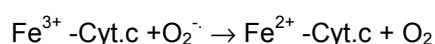
Folgende Reaktionssysteme wurden hinsichtlich ihrer $O_2^{\cdot-}$ -Detektionseigenschaften untersucht:

3.4.1 Reduktion von Cytochrom c.

Cytochrom c ist ein Hämprotein und kommt in Organismus als Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette vor. Das dreiwertige Häm-Eisen (Abb. 1) kann

univalent reduziert werden, wobei im Spektrum eine Absorptionsbande bei 550nm entsteht (Abb. 2). Als Reduktant des Cytochrom c kann auch das Superoxidradikal auftreten.

Ferricytochrom c wird durch Superoxidradikale zum Ferrocyclochrom c reduziert:



Reaktion 13

Die experimentell bestimmte Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 13 wird bei physiologischen pH-Werten im Bereich zwischen $2.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben [20]. Die gute Wasserlöslichkeit, ein hoher Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [71]) sowie die große Reaktionsgeschwindigkeit, mit der Cytochrom c durch Superoxidradikale reduziert wird, haben zu seiner weitverbreiteten Anwendung für den Superoxidnachweis an verschiedenen biologischen Systemen geführt, zu denen vor allem stimulierte Zellen [42,62,82,149] sowie isolierte Enzyme [50,55,62,80] zählen.

Die Bildung des reduzierten Cytochrom c wurde bei der Wellenlänge 550nm verfolgt, wenn $Fe^{3+}\text{-Cyt.c}$ mit dem $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) inkubiert wurde.

Der Nachweis der Superoxidradikale erfolgte bei verschiedenen Superoxid-Bildungsraten, die zuvor in Kontrollexperimenten (d.h. ohne Zusatz von Farbstoff) aus der Harnsäurebildung spektrophotometrisch bestimmt wurden (s. Kapitel 0, Gleichung 3).

Bei Berechnung der nachgewiesenen Superoxidbildungsrate aus der Bildungsrate des Reaktionsproduktes (reduzierten Cytochrom c) wurden sie gleich gesetzt, da die Reaktionstöchiometrie 1:1 ist ($n=1$ in Gleichung 10).

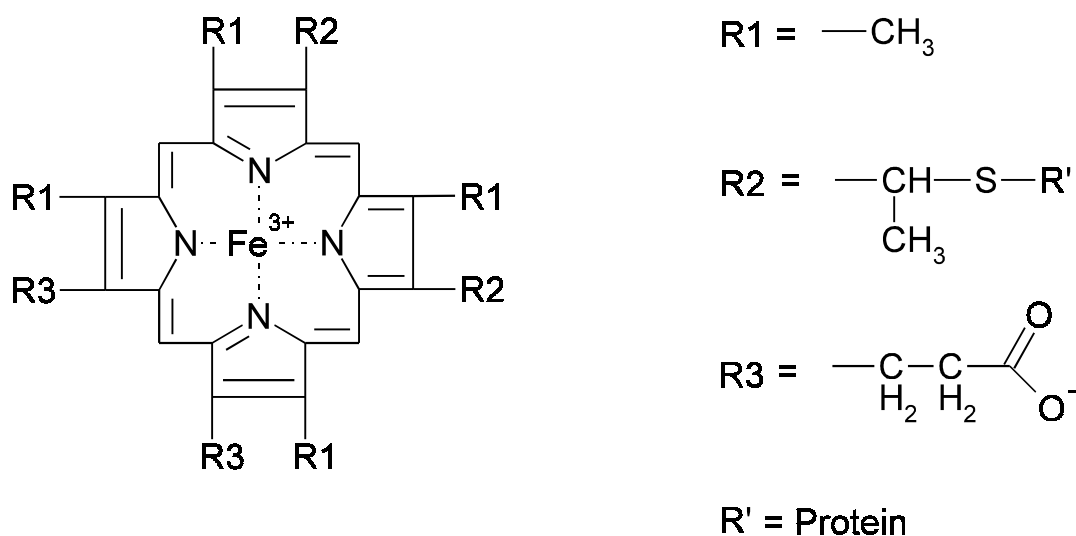


Abb. 1. Häm-Gruppe des Cytochrom c.

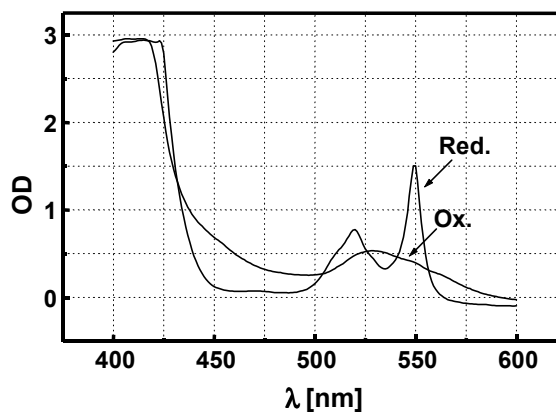


Abb. 2. Spektren des oxidierten und reduzierten Cytochrom c.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3 dargestellt. Die Abhängigkeit der $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate von der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate (im Xanthin/Xanthinoxidase System) konnte mit hoher Genauigkeit ($r=0.99$) linear approximiert werden, wobei sich ein Steigungskoeffizient von 0.365 ergab (Abb. 3).

Um die Beteiligung der Superoxidradikale an der Reduktion von Cytochrom c klarzustellen, wurde der Einfluß von SOD auf diese Reaktion untersucht (s. Kapitel 0). Hierfür wurde die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung in Anwesenheit von Cytochrom c gestartet, die Bildungsrate des reduzierten Cytochrom c ca. 2min. lang gemessen und SOD zugegeben. Die Bildungsrate des reduzierten Cytochrom c wurde nach der SOD-Zugabe erneut gemessen und die Ergebnisse in der prozentualen Hemmung im Bezug auf die Reduktionsrate vor der SOD-Zugabe dargestellt (Abb. 4).

Da die Reduktion von Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System bis zu 98% SOD-hemmbar war (Abb. 4), kann sie hauptsächlich auf die Reaktion mit Superoxidradikalen zurückgeführt werden. Der über die Cytochrom-c-Methode nachgewiesene Anteil der Superoxidradikale von 0.365 muß somit auf $0.365 \times 0.98 = 0.358$ korrigiert werden.

Acetyliertes Cytochrom c, das zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an den Cytochrom-Oxidoreduktasen enthaltenden biologischen Systemen eingesetzt wird [11,62,93], wurde ebenfalls im Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystem getestet. Die experimentellen Bedingungen für den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis waren wie in der Legende zu Abb. 3 angegeben. Die Konzentration des acetylierten Cytochrom c betrug ebenfalls $50 \mu M$. Mit diesem Farbstoff ergibt sich der nachgewiesene Anteil von 0.321 ± 0.022 (Tabelle 3). Der Unterschied zwischen diesem Wert und dem des nicht-derivatisierten Cytochrom c ist nicht signifikant.

Tabelle 3. Nachweis der Superoxidbildung im Xanthin/Xanthinoxidase System mit acetyliertem Cytochrom c.

| Produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate, $\mu M/min$ | Nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate, $\mu M/min$ | Nachgewiesener Anteil (MW \pm SD) |
|---|---|-------------------------------------|
| 2.22 ± 0.11 (n=4) | 0.714 ± 0.051 (n=7) | 0.321 ± 0.022 |

Die Reduktion des acetylierten Cytochrom c, die unter identischen Bedingungen wie die des nicht-derivatisierten Cytochrom c untersucht wurde, war vollkommen mit SOD hemmbar (Abb. 5).

Die unerwartet niedrige Wiederfindungsrate könnte die Folge von störenden Nebenreaktionen zwischen Cytochrom c und anderen Komponenten im System sein. So konnte beispielsweise die nachfolgende Oxidation des reduzierten Cytochrom c durch Xanthinoxidase, durch Superoxidradikale, durch Wasserstoffperoxid oder durch Harnsäure hierbei eine Rolle spielen.

Die Reaktionen zwischen reduziertem Cytochrom c und Harnsäure sowie Wasserstoffperoxid sind thermodynamisch möglich. So betragen die Standard-Reduktionspotentiale +590mV für die Harnsäure, +320mV für Wasserstoffperoxid und -260mV für die Oxidation des Ferrocycytochrom c [33]. Daraus errechnet sich ein $\Delta E = (590 - 260)\text{mV} = 330\text{mV}$ für die Reaktion zwischen der Harnsäure und reduziertem Cytochrom c, bzw. $\Delta E = (320 - 260)\text{mV} = 60\text{mV}$ für die Reaktion mit H_2O_2 .

Um zu überprüfen, ob diese Nebenreaktionen unter physiologisch relevanten Bedingungen tatsächlich ablaufen, wurde das durch Dithionit reduzierte Cytochrom c mit Xanthinoxidase, Wasserstoffperoxid oder mit Harnsäure inkubiert und die möglichen Veränderungen der optischen Dichte bei 550nm verfolgt. Keine Abnahme der optischen Dichte bei 550 nm, die für eine Oxidation des reduzierten Cytochrom c charakteristisch ist, wurde in Anwesenheit dieser Komponenten beobachtet.

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die vermutete Oxidation des reduzierten Cytochrom c durch andere Komponenten des Systems nicht stattfindet.

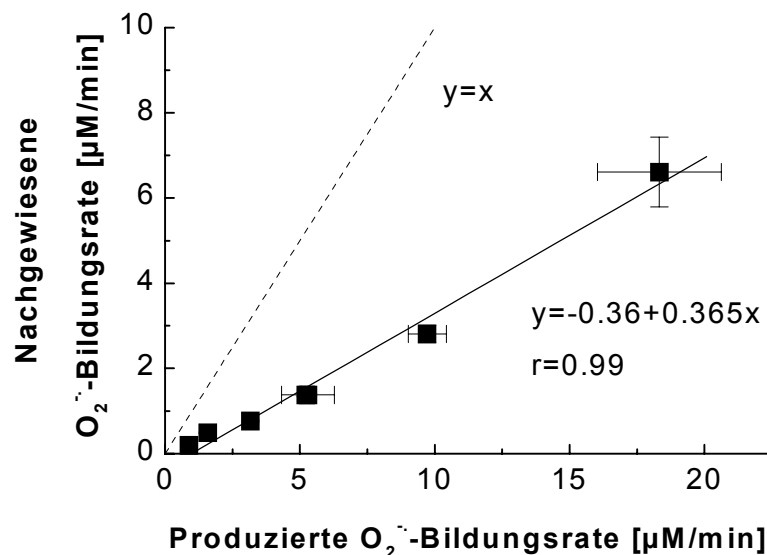


Abb. 3. Detektion der Superoxidradikale mit Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System. Die Reaktion wurde in 100mM Phosphatpuffer, pH=7.4, in Anwesenheit des Eisenchelators DTPA (1mM) und 200U/ml Katalase bei $T=37^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Konzentration des Cytochrom c war $50\mu\text{M}$ und die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung wurde durch Zugabe von $100\mu\text{M}$ Xanthin gestartet.

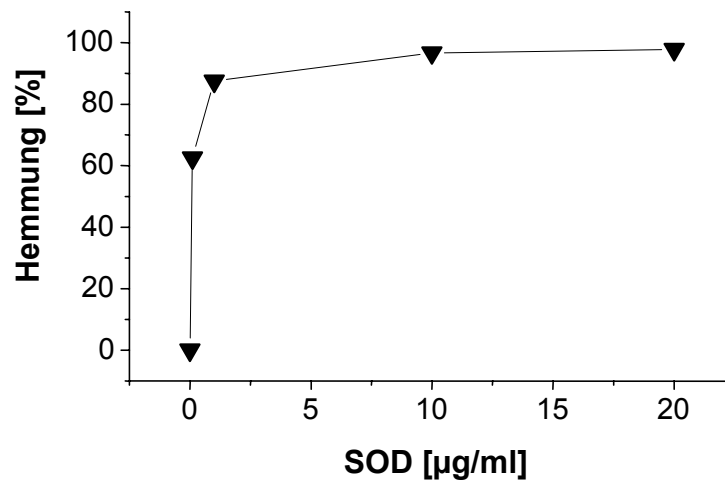


Abb. 4. SOD-Hemmung der Reduktion von Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System. Das Reaktionsgemisch bestand aus: 1ml 100mM Phosphatpuffer, pH=7.4, 1mMDTPA, 200U/ml Katalase, 50µM Cytochrom c. Die aus Harnsäurebildung errechnete Superoxidbildungsrate betrug 16.5µM/min. Die angegebene SOD-Menge wurde in 5µl H₂O zugesetzt.

Die experimentellen Befunde sprechen dafür, daß die Superoxidradikale hauptsächlich über eine Reaktion mit Cytochrom c und nicht über spontane Dismutation eliminiert werden. Wäre dies anders, dann sollten die höheren Konzentrationen des Cytochrom c mit der Spontandismutation effizienter konkurrieren und so die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochrom c vergrößern. Die Abb. 6 zeigt aber, daß es zu keiner Erhöhung der Reduktionsrate kommt, wenn größere Konzentrationen des Cytochrom c eingesetzt werden. Es ist daher davon auszugehen, daß die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochrom c den O₂⁻-Nachweis unter diesen Bedingungen nicht limitiert.

Eine zusätzliche Information, ob der geringe nachgewiesene Anteil von O₂⁻-Radikalen in diesem

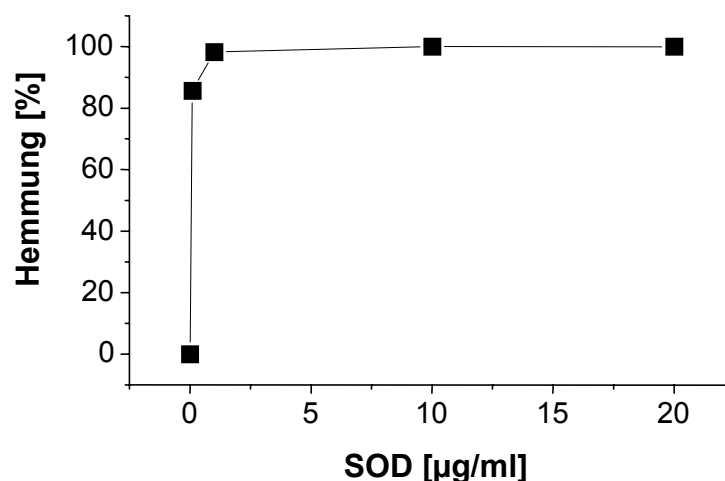
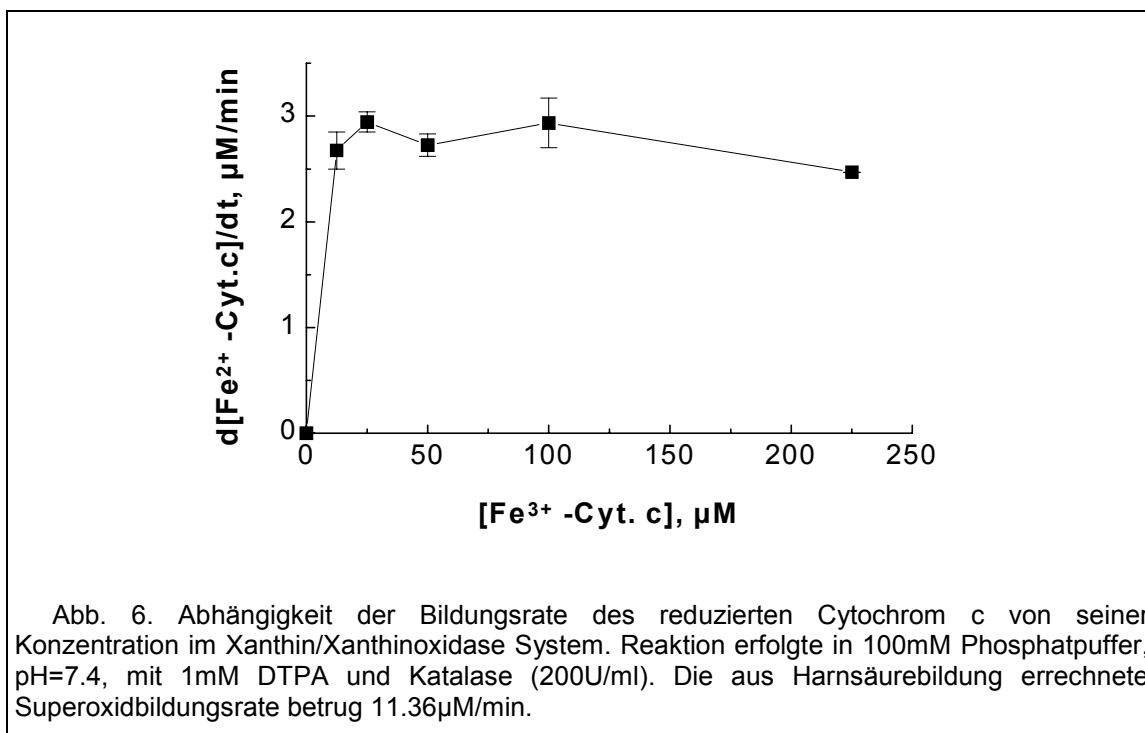


Abb. 5. SOD-Hemmung der Reduktion von acetyliertem Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System. Das Reaktionsgemisch bestand aus: 100mM Phosphatpuffer, pH=7.4, 1mM DTPA, 50µM acetyliertes Cytochrom c, 200U/ml Katalase. Die aus Harnsäurebildung errechnete Superoxidbildungsrate betrug 2.22µM/min.



System auf die spontane Dismutation zurückzuführen ist, kann die mathematische Modellrechnung geben. Gemäß Gleichung 9 beträgt der nicht detektierbare Anteil von dismutierten Superoxidradikalen $\alpha \approx 0.001 \ll 1$, wenn die Superoxidbildungsrate mit $v = 10^6 \text{ M s}^{-1}$ angenommen wurde, die Konzentration von Cytochrom c $N = 100 \mu\text{M}$ war und die Reaktionskonstante $k_8 = 2.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beträgt.

Eine Reaktion des Cytochrom c mit Superoxidradikalen, in welcher ein Elektron nicht auf das Häm-Eisen sondern auf die Aminosäuren des Proteinteils übertragen und daher über die Messungen der optischen Dichte bei 550nm nicht erfaßt wird, wäre noch eine weitere denkbare Ursache, die zu einer verminderten Wiederfindungsrate beiträgt.

Ob diese Reaktion tatsächlich einen Einfluß auf den Superoxidnachweis hat, wurde über den Einfluß des reduzierten Cytochrom c auf einen anderen spektrophotometrischen Superoxidnachweis überprüft. Hierbei wurde die durch Superoxid vermittelte Reduktion von Nitroblau Tetrazolium (NBT) zum farbigen Produkt Formazan ($\lambda = 560 \text{ nm}$) (s. Kapitel 0), in An- und Abwesenheit von reduzierten Cytochrom c untersucht. Die vorhergehende Reduktion des Häm-Eisens des Cytochrom durch Dithionit war erforderlich, um die schon bekannte Reaktion zwischen Superoxidradikalen und Häm-Eisen auszuschließen.

Nitroblau Tetrazolium reagiert mit Superoxidradikalen ca. 10mal langsamer als Cytochrom c, so daß das NBT-System mögliche Konkurrenzreaktionen durch die verminderte Formazanbildung anzeigen sollte, während die Cytochrom c -Reduktion weniger beeinflusst wäre. Unter der Annahme, daß Superoxidradikale mit dem Proteianteil des Cytochrom c reagierten, wäre eine Abnahme der Formazanbildungsrate in Anwesenheit des reduzierten Cytochrom feststellbar. Die in Tabelle 4 zusammengefaßten experimentellen Daten zeigen aber, daß die Reaktion zwischen den Superoxidradikalen und dem Proteianteil des Cytochrom vernachlässigbar gering ist, da die Reduktionsrate von NBT durch Zugabe des reduzierten Cytochrom c nicht beeinflusst wird.

Tabelle 4. Die Reaktivität des Proteinteils von Cytochrom c mit Superoxidradikalen.

| Reduktionsrate von NBT im X/XOD System, μM/min | |
|--|------------------|
| ohne red. Cyt.c. | +50μM red. Cyt.c |
| 7,64±0,14 (n=3) | 7,22±0,30 (n=3) |

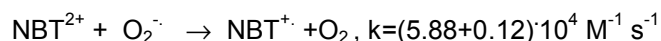
Bei der Untersuchung der Effizienz des quantitativen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises mit der Cytochrom c -Methode in dem Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) hat sich ein nachgewiesener Anteil von 0.357 ergeben. Wurde acetyliertes Cytochrom c als Reaktionspartner für den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis eingesetzt, dann ergab dies keine Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate. Da keine von den oben untersuchten Nebenreaktionen die beobachtete Diskrepanz von $1-0.357=0.643$ zwischen der errechneten und der nachgewiesenen Superoxidbildungsrate erklären kann, muß sie als eine Eigenschaft des enzymatischen Modellsystems betrachtet werden.

3.4.2 Reduktion von Nitroblau Tetrazolium (NBT).

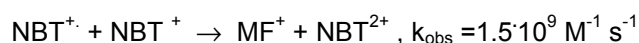
Nitroblau Tetrazolium (NBT) ist ein gelb gefärbter wasserlöslicher Farbstoff, der zu den Tetrazolium Salzen gehört. Nachdem Beauchamp und Fridovich Nitroblau Tetrazolium zur Bestimmung der SOD-Aktivität verwendet haben [18], versuchten mehrere Forscher das NBT auch für den Superoxidnachweis an verschiedenen biologischen Systemen anzuwenden.

NBT reagiert mit Superoxid, wobei Formazane, dunkelblaue Reaktionsprodukte entstehen. Zwei $O_2^{\cdot-}$ -Moleküle sind für die Bildung eines Moleküls Monoformazan erforderlich, der Mechanismus dieser Reaktion ist jedoch komplex (Abb. 7).

NBT liegt bei physiologischen pH-Werten als Dikation NBT^{2+} vor. NBT^{2+} wird durch Superoxid zum $NBT^{\cdot+}$ -Radikal reduziert (Reaktion 14), wobei die Geschwindigkeitskonstante $(5.88 \pm 0.12) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beträgt [21]. Letzteres reagiert über Disproportionierung, wobei Monoformazan und NBT^{2+} gebildet werden (Reaktion 15).

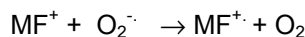


Reaktion 14

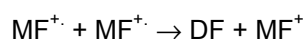


Reaktion 15

Das dunkelblaue Reaktionsprodukt Monoformazan (MF^+) hat bei 530nm ein Absorptionsmaximum ($\epsilon_{530\text{nm}} = 17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [21]). Die weitere Reduktion des Monoformazans führt zur Bildung von Diformazan, das ein Absorptionmaximum bei 560nm hat:



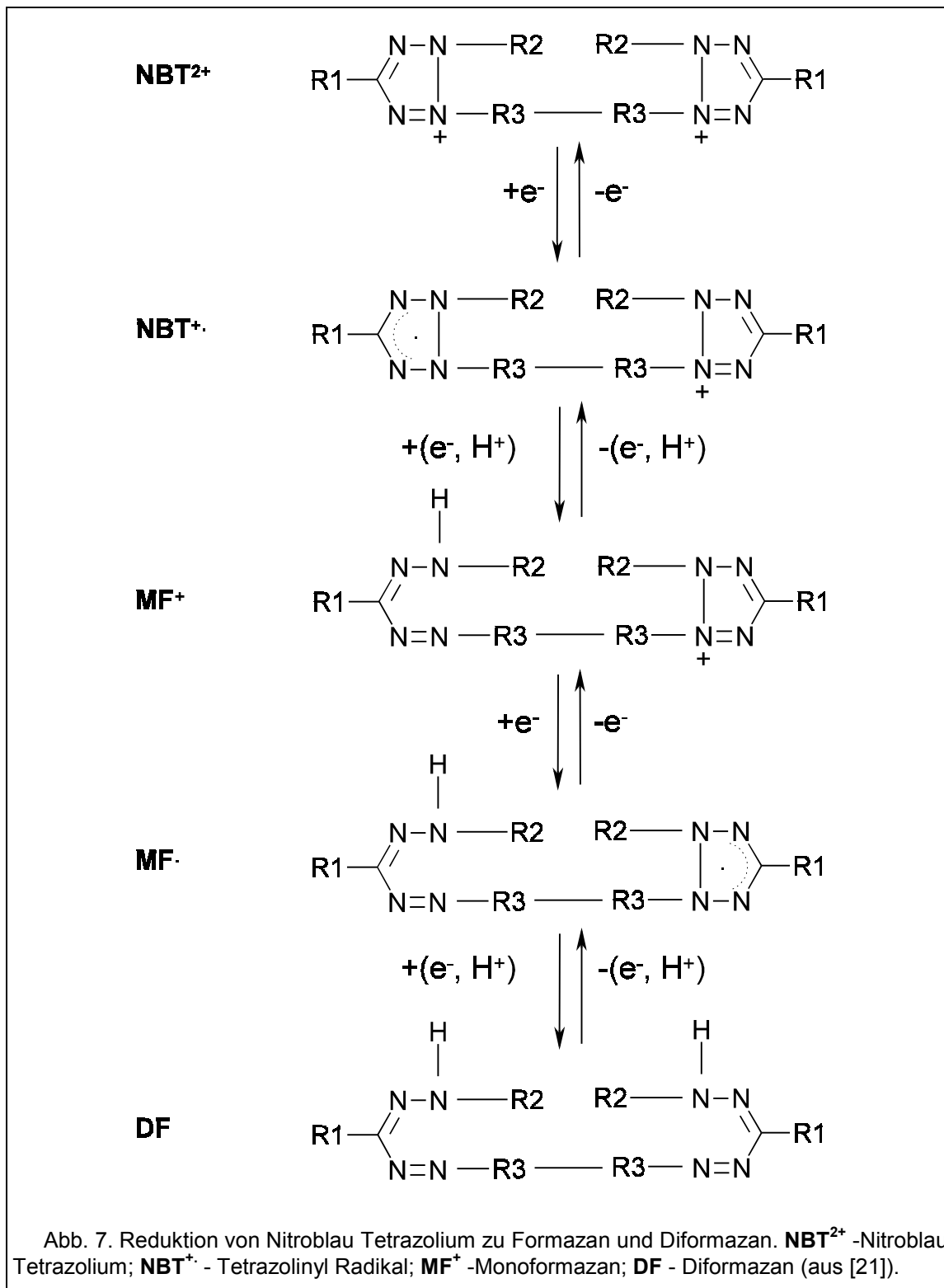
Reaktion 16



Reaktion 17

Im Unterschied zum $O_2^{\cdot-}$ -Radikal, reagiert das Perhydroxylradikal HO_2^{\cdot} , die konjugierte Säure von $O_2^{\cdot-}$, kaum mit NBT^{2+} [21]. Da der pK_a Wert für $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ bei 4.8 liegt, läuft die Nachweisreaktion problemlos im physiologischen pH-Bereich ab.

Da Formazan schwer wasserlöslich ist und leicht ausfällt, kann NBT prinzipiell nur für den Nachweis niedriger $O_2^{\cdot -}$ -Bildungsraten verwendet werden (bis zu $6\mu M/min$ in den hier dargestellten Experimenten). Auf einen Zusatz von Gelatine, welches ausfallendes Formazan in der Lösung suspendiert, wurde wegen der möglichen zusätzlichen Verunreinigungen und Wechselwirkungen mit dem Superoxid- Bildungs- und Nachweis- System in den im folgenden beschriebenen Experimenten verzichtet.



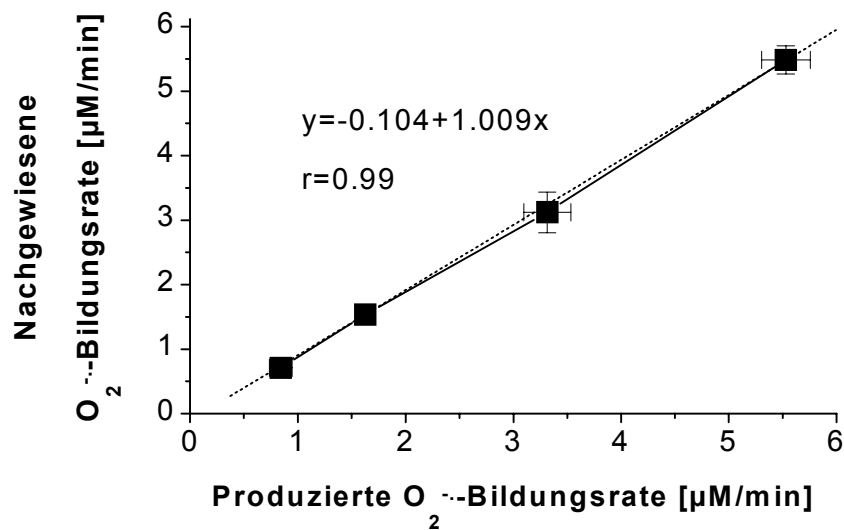


Abb. 8. Detektion der Superoxidradikale im Xanthin-Xanthin-Oxidase System mit Nitroblau Tetrazolium. Reaktion ist in 100mM Phosphat-Puffer, pH=7.4, in Anwesenheit des Eisenchelators DTPA (1mM) und Katalase bei T=37°C durchgeführt. Die Konzentration des NBT war 100 μ M und die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung wurde durch Zugabe von 100 μ M Xanthin gestartet.

Um die Effizienz des Superoxidnachweises mit diesem Farbstoff zu bestimmen, wurde - in Analogie zum Cytochrom c - die Abhängigkeit der nachgewiesenen $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsrate von der produzierten $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsrate untersucht. Die letztere wurde aus der Harnsäurebildungsrate errechnet. Für die formelle Umrechnung der nachgewiesenen Superoxidbildungsrate aus der Formazanbildung wurde der Koeffizient n in Gleichung 10 n=2 gesetzt, da die Reaktionsstöchiometrie Superoxid/(Mono)Formazan 2:1 ist.

Die in Abb. 8 dargestellten Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß die $O_2^{\bullet-}$ -Wiederfindungsrate mit NBT als Nachweissubstanz eine lineare Abhängigkeit von der Superoxidbildungsrate aufweist. Der aus der linearen Approximierung errechnete Steigungskoeffizient betrug 1.009, d.h. daß die nachgewiesene $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsrate mit der produzierten $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsrate quantitativ identisch ist, wenn NBT für den Superoxidnachweis eingesetzt wird.

Ob die Reduktion von NBT ausschließlich durch Superoxidradikale erfolgt (qualitative Selektivität), wurde aus dem Einfluß der SOD auf die Bildungsrate des Reaktionsproduktes (Formazan) abgeleitet (Kapitel 0). Um dies zu untersuchen, wurde die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung in Anwesenheit von NBT im Modellsystem gestartet, die Bildungsrate des Reaktionsproduktes ca. 2min lang verfolgt und SOD zugegeben. Die resultierende Abnahme der Formazanbildungsrate wurde in Prozenten der ungehemmten Bildungsrate des Reaktionsproduktes berechnet.

Bei dieser Überprüfung der qualitativen Selektivität der Methode wurde festgestellt, daß nur maximal 80% der NBT-Reduktion mit SOD hemmbar waren (Abb. 9). Aus dem Grund muß der nachgewiesene Anteil von 1.009 mit einem Faktor von 0.8 multipliziert werden ($1.009 \times 0.8 = 0.81$), damit nur die gegen SOD sensitive Komponente der Bildung des Reaktionsproduktes berücksichtigt wird. Somit beziffert sich der mit NBT nachgewiesene korrigierte Anteil von Superoxidradikalen auf 0.81.

Um herauszufinden, ob der durch SOD nicht zu hemmende Anteil der NBT-Reduktion auf eine Reaktion mit anderen Komponenten des $O_2^{\bullet-}$ -Bildungssystem zurückzuführen ist, wurde NBT einzeln mit Harnsäure, Xanthin und H_2O_2 inkubiert. Keine von diesen einzelnen Verbindungen konnte NBT direkt reduzieren, was jedoch die Möglichkeit einer direkten Elektronenübertragung von Xanthin durch Xanthinoxidase auf NBT offen läßt [18].

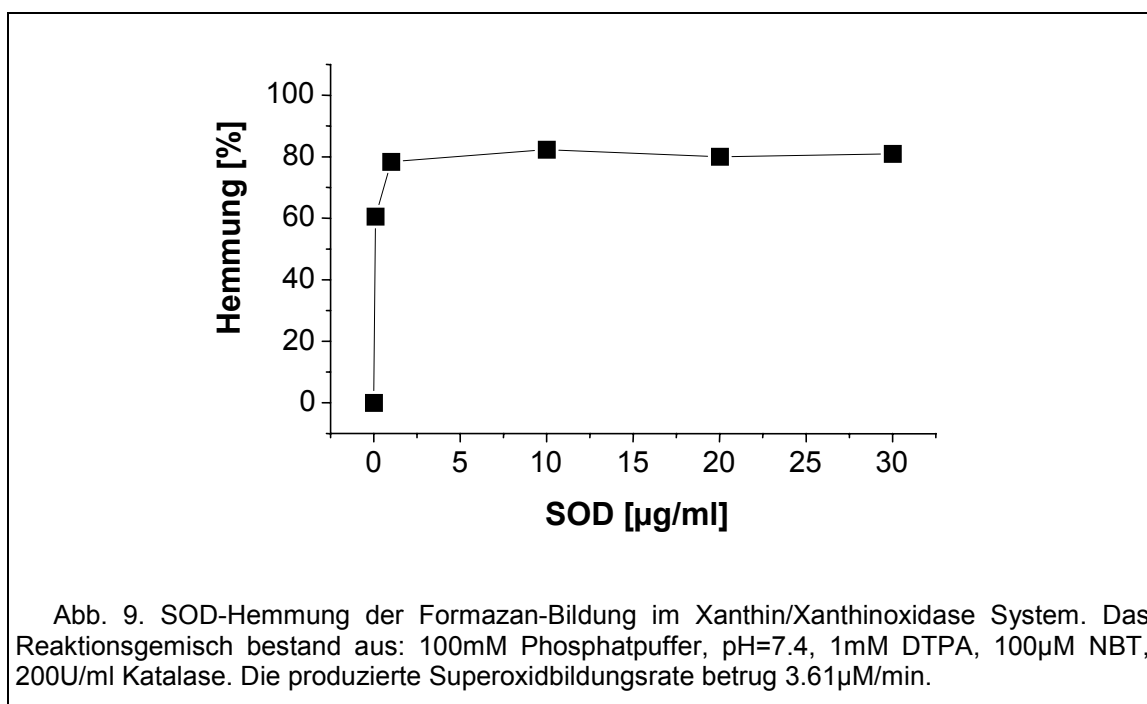
Der Anteil spontan dismutierter $O_2^{\bullet-}$ -Radikale läßt sich nach Gleichung 9 abschätzen. Für die $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsgeschwindigkeit von $v = 10^{-6} M s^{-1}$ und für die eingesetzte Farbstoffkonzentration von

$N=100\mu\text{M}$ beträgt der errechnete Anteil α spontan dismutierter Superoxidradikale (Gleichung 9) weniger als 0.01 und kann demzufolge keinen wesentlichen Beitrag zur Verminderung der nachweisbaren $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate leisten.

Die Berechnungen des nachgewiesenen Anteils der Superoxidradikale wurden unter der Annahme durchgeführt, daß hauptsächlich Monoformazan als 2-Elektronen-Reduktionsprodukt beim $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Nachweis im Xanthin/Xanthinoxidase System gebildet wird. Die Möglichkeit einer 4-Elektronen-Reduktion von NBT, die in einer Diformazanbildung resultiert (Abb. 7), ist theoretisch nicht ausgeschlossen. Die Spektren von Monoformazan und Diformazan überlappen sich [37], so daß das letztere, wenn es gebildet wird, ebenfalls zu der bei 540nm registrierten optischen Dichte beitragen kann.

Für die Untersuchung der im Xanthin/Xanthinoxidase System entstandenen Reduktionsprodukte von NBT wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die Superoxidbildung wurde in Anwesenheit von NBT gestartet, die Proben für die chromatographische Analyse mit einem Zeitabstand von 2min abgenommen und auf die chromatographische Platte aufgetragen. Nach der Trennung wurden drei Flecke mit den folgenden R_f -Werten erhalten: $R_{f1}=0.01$; $R_{f2}=0.43$; $R_{f3}=0.65$. Die Analyse der Spektren ergab, daß es sich bei dem Fleck 2 ($R_{f2}=0.43$) um nicht-reduziertes gelb gefärbtes NBT handelt, während Fleck 1 und Fleck 3 zu den zwei verschiedenen blau gefärbten Reduktionsprodukten gehören, welche dem Diformazan bzw. dem Monoformazan zugeschrieben werden können. Dabei ist zu bemerken, daß die Flecken der beiden Reduktionsprodukte in allen zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben zu sehen waren, d.h. daß die beiden Reaktionsprodukte, Mono- und Diformazan, gleichzeitig bei der Reduktion von NBT im Modellsystem gebildet werden.

Der mit der NBT-Methode im Modellsystem wiedergefundene Anteil der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale bezieht sich auf 0.81, wenn nur die SOD-sensitive Komponente der NBT-Reduktion berücksichtigt und Monoformazan als hauptsächliches Reaktionsprodukt angenommen wird. Da aber das zur Absorption beitragende Diformazan neben dem Monoformazan gebildet wird, ist eine genaue Quantifizierung der Superoxidbildung nur über die Veränderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge nicht möglich.



3.4.3 Oxidation von Epinephrin.

Epinephrin (Adrenalin, Abb. 10) gehört zu den Cathecholaminen und ist ein Hormon mit vielseitigen regulatorischen Funktionen. Im Unterschied zu NBT und Cytochrom c, die durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale reduziert werden, wird Epinephrin durch Superoxid oxidiert [92].

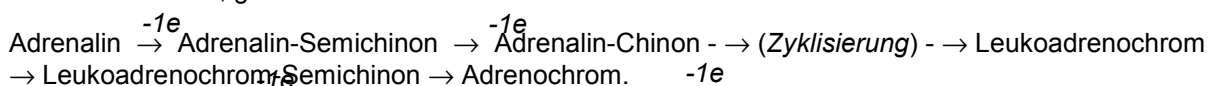
Die Oxidation von Epinephrin (Adrenalin) durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale führt zur Bildung des Adrenochroms (Abb. 10, Absorptionmaximum bei 480 nm) und des Wasserstoffperoxides. Die Reaktion läuft nach einem komplexen Mechanismus ab. Der erste Schritt der Oxidation von Adrenalin zum Adrenalin-Semichinon (SQ) ist die limitierende Stufe der Adrenochrombildung [25].



Reaktion 18

Für die Reaktion 18 ist die Geschwindigkeitskonstante mit $k=5.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\text{pH}=7.8$, in der Literatur angegeben [25].

Bei der Abgabe von insgesamt 4 Elektronen durch Epinephrin wird ein gefärbtes Oxidationsprodukt, das Adrenochrom, gebildet:

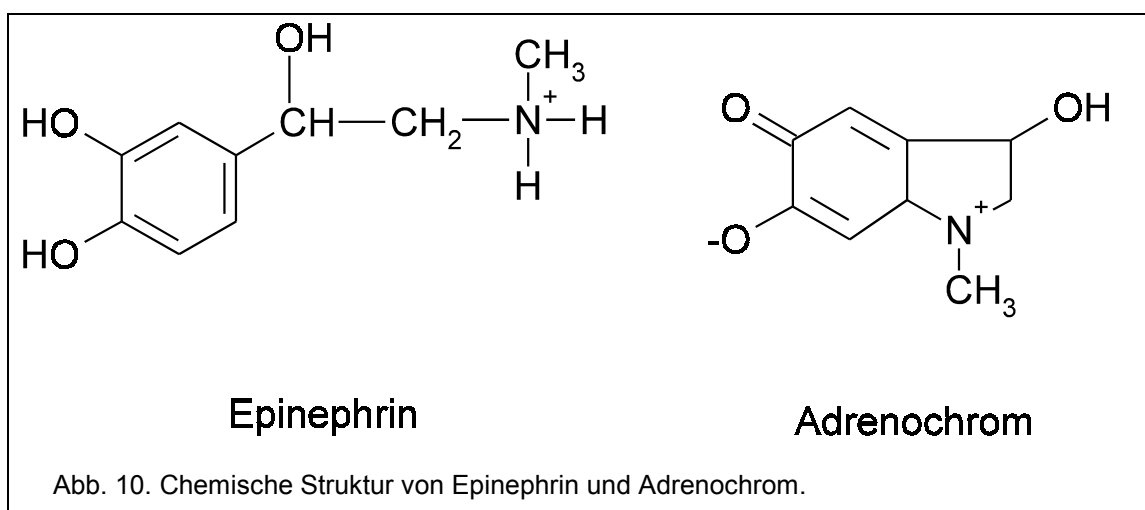


Der genaue Oxidationsmechanismus des Epinephrins zum Adrenochrom hängt vom pH-Wert des Systems ab. Das Absorptionsmaximum des Adrenochroms liegt bei 480nm und der Extinktionskoeffizient ist mit $\epsilon_{480\text{nm}}=2.86 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\text{pH}=7.4$) relativ niedrig.

Die in dem Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) vorhandene Katalase hat bei dieser Nachweismethode noch eine zusätzliche Funktion. Sie verhindert eine Verlangsamung der limitierenden Reaktion 18, indem sie das Reaktionsprodukt H_2O_2 umsetzt (Reaktion 4).

Wird die Superoxidradikalbildung durch das Xanthin/Xanthinoxidase System in Anwesenheit von Epinephrin gestartet, kann die Adrenochrombildung spektrophotometrisch registriert werden. Vor dem Beginn der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung, die durch Zugabe von Xanthin erfolgte, wurde keine Autoxidation von Adrenalin zu Adrenochrom in dem System beobachtet. Wie beim $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis mit den anderen Farbstoffen, wurde die produzierte Superoxidbildungsrate (aus der Harnsäurebildungsrate nach Gleichung 10 errechnet) variiert und die Adrenochrombildungsrate gemessen.

Für die Umrechnung der nachgewiesenen $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate aus der Adrenochrombildungsrate wurde die Reaktionsstöchiometrie mit einbezogen. Da ein Adrenalinmolekül für die Bildung eines Adrenochrommoleküls 4 Elektronen abgeben muß, wurden 4 Superoxidmoleküle als Elektronenakzeptoren angenommen. Unter dieser Zugrundelegung ergibt sich eine 4:1 Superoxid : Adrenochrom - Reaktionsstöchiometrie und die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde mit dem Faktor 4 aus der Adrenochrombildung ermittelt ($n=4$ in Gleichung 10).



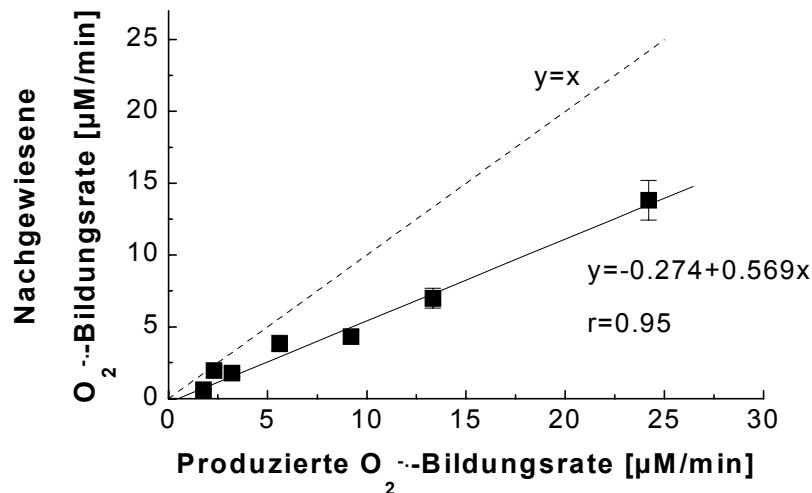


Abb. 11. Detektion der Superoxidradikale im Xanthin/Xanthinoxidase System mit Epinephrin. Die Reaktion wurde in 100mM Phosphat-Puffer, pH=7.4, in Anwesenheit von 1mM DTPA und Katalase bei 37°C durchgeführt. Die Konzentration des Epinephrins betrug 1mM. Die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung wurde durch Zugabe von 100 μM Xanthin gestartet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 11 dargestellt. Beim quantitativen Nachweis der Superoxidbildung im X/XOD-System lag der mit Epinephrin nachgewiesene Anteil der Superoxidradikale bei 0.569. Dies wurde aus dem Steigungskoeffizienten der linearen Approximierung der Abhängigkeit nachgewiesener von produzierter $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsrate bestimmt (Abb. 11).

Die in den oben beschriebenen Experimenten eingesetzte Konzentration des Adrenalins von 1mM war ausreichend, um mit $O_2^{\bullet-}$ -Radikalen effizient zu reagieren. Dies folgt aus den Experimenten, wenn die Konzentration des Adrenalin zwischen 0.5 und 4 mM bei einer konstanten Superoxidbildungsrate variiert wurde. Wie Abb. 12 zeigt, wurde keinen Anstieg der Adrenochrombildungsrate mit Erhöhung der Adrenalinkonzentration festgestellt.

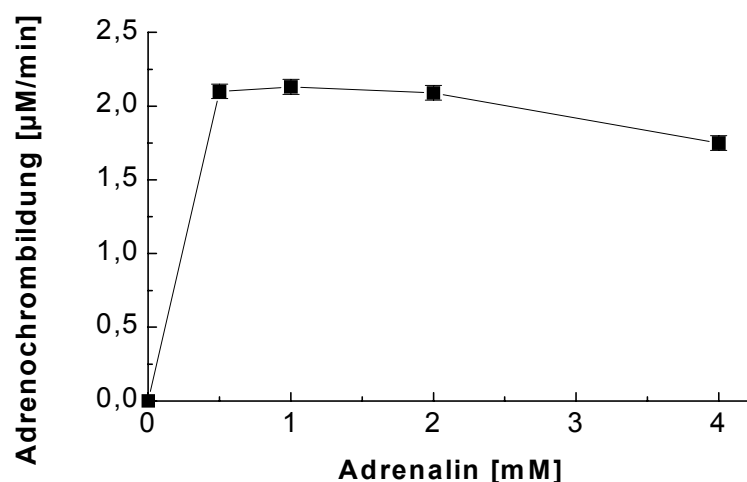


Abb. 12. Abhängigkeit der Adrenochrom-Bildungsrate von der Konzentration des Adrenalins beim Nachweis der Superoxidbildung im Xanthin/Xanthinoxidase System. Die Reaktion wurde in 100mM Phosphatpuffer, pH=7.4, 1mM DTPA, 200U/ml Katalase durchgeführt. Die produzierte Superoxidbildungsrate betrug 15.85 $\mu M/min$.

Die Adrenochrombildung war vollkommen mit SOD zu hemmen (Abb. 13), was auf die Beteiligung der Superoxidradikale in dieser Reaktion hinweist.

Die Anwendung der Adrenalin-Methode ist wegen des geringen Extinktionskoeffizienten des gebildeten Adrenochroms nur sinnvoll, wenn Superoxidbildungsrate größer als $5\mu\text{M min}^{-1}$ erwartet werden, da die Änderungen der optischen Dichte sonst nur schlecht quantifizierbar sind (wenn die Bestimmung in einer 1cm-Standardküvette erfolgt).

Der Anteil der spontan dismutierten und deswegen nicht erfaßten $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale muß ebenfalls berücksichtigt werden. Wie nach Gleichung 9 berechnet, eliminieren die Superoxidradikale mindestens 200 mal schneller über die Reaktion mit Epinephrin als über die Spontandismutation, wenn die Konzentration des Epinephrins 1mM beträgt und die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale mit der Geschwindigkeit v von 10^{-6} M s^{-1} produziert werden ($\alpha \ll 1$).

Somit wurde mit der Epinephrin-Methode ein Anteil von 0.569 der im Modellsystem produzierten Superoxidbildungsrate nachgewiesen. Der Kettenreaktionsmechanismus der Adrenochrombildung muß jedoch bei der Interpretation dieses Wertes in Betracht gezogen werden.

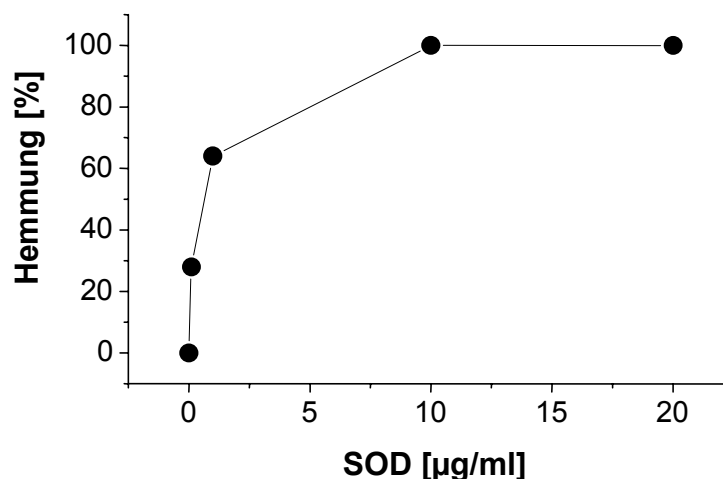


Abb. 13. Hemmung der Adrenochrom-Bildung mit SOD im Xanthin/Xanthinoxidase System; Reaktionsbedingungen wie bei der Abb. 11 angegeben. Die produzierte Superoxidbildungsrate betrug $11.36\mu\text{M/min}$.

3.5 Chemilumineszenz - Methoden zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis im Xanthin/Xanthinoxidase-System.

Die Anwendung von Chemilumineszenz-Methoden zum Radikalnachweis ist weit verbreitet. Das Meßprinzip nutzt die Tatsache, daß bei chemischen Reaktionen bestimmter Verbindungen mit Radikalen angeregte Reaktionsprodukte, meist im Triplettzustand, gebildet werden. Bei Dissipation der angeregten Reaktionsprodukte in den Grundzustand wird ein Teil der Energie in Form von Lichtquanten abgegeben, die mit photoempfindlichen Elementen (z.B. Photomultiplier) meßbar ist. Moderne Photomultiplier besitzen eine hohe Empfindlichkeit und ermöglichen damit einen sehr sensitiven Nachweis der Chemilumineszenz.

Luminol und Lucigenin werden häufig für den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis mittels Chemilumineszenz an komplexen biologischen Systemen eingesetzt [4,5,85]. Der genauere der Chemilumineszenz zugrunde liegende Reaktionsmechanismus weist für beide Indikatoren komplexe chemische Abläufe auf. Im Falle des Lucigenins ist als erster Schritt eine univalente Reduktion erforderlich, um den komplexen Reaktionsmechanismus, der zur Chemilumineszenz führt, auszulösen [5]. Hingegen erfordert die durch Luminol verursachte Chemilumineszenz zunächst eine univalente Oxidation zum Luminol-Radikal, der eine univalente Reduktion folgen muß [88]. In diesem Fall muß das Radikal sowohl die univalente Oxidation als auch die nachfolgende Reduktion vermitteln können, um die Chemilumineszenz auszulösen.

In diesem Teil der Arbeit wurde die durch Luminol und Lucigenin vermittelte Chemilumineszenz hinsichtlich der quantitativen und qualitativen $O_2^{\cdot-}$ -Bestimmung untersucht. Die Reaktion der enzymatischen Oxidation des Xanthins durch Xanthinoxidase diente wiederum als Superoxidbildungsquelle, wobei die produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate über die Harnsäurebildung kontrolliert wurde (Kapitel 3.1, Gleichung 8).

Wurde die Superoxidbildung im Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) in Anwesenheit des Luminols oder des Lucigenins gestartet, so wurde eine die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung begleitende Chemilumineszenz registriert (Abb. 14). Die Chemilumineszenzkinetik des Luminols unterscheidet sich deutlich von der des Lucigenins. Im Fall des Luminols steigt die Intensität der Chemilumineszenz sofort mit der Bildung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale an, nach Erreichen eines Maximums fällt sie trotz weiter anhaltender $O_2^{\cdot-}$ -Bildung jedoch innerhalb weniger Minuten ab (Abb. 14, A). Hingegen verbleibt die Intensität der Chemilumineszenz im Falle des Lucigenins nach Erreichen eines Maximums auf einem stationären Niveau (Abb. 14, B).

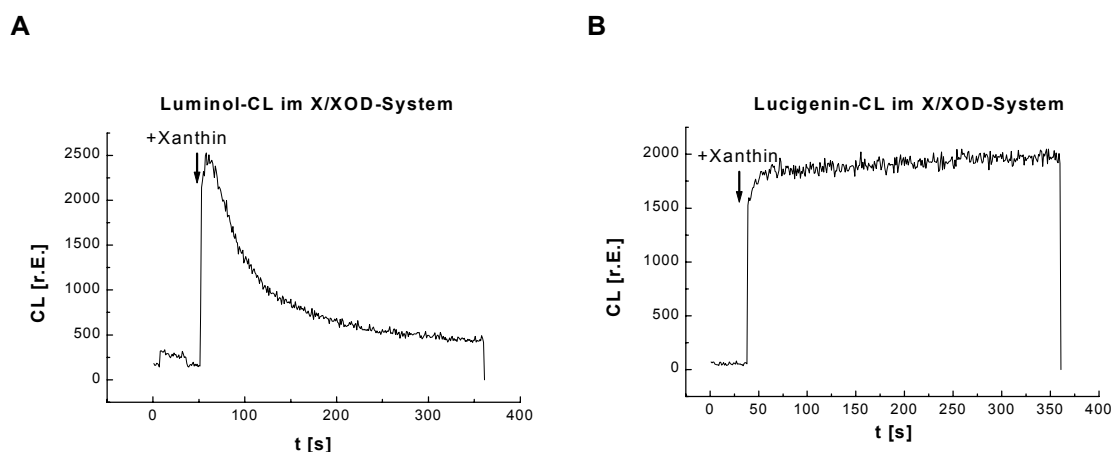


Abb. 14 Chemilumineszenz-Kinetik von Luminol (A) und Lucigenin (B) im Xanthin/Xanthinoxidase System. Die Reaktion wurde in 100mM Phosphatpuffer (4ml) mit 1mM DTPA, pH=7.4, in Anwesenheit von 200U/ml Katalase bei $T=37^{\circ}C$ durchgeführt. Die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung wurde durch Zugabe von 100 μM Xanthin gestartet, wie mit den Pfeilen gekennzeichnet. Die Konzentration des Luminols sowie die des Lucigenins betrug 50 μM .

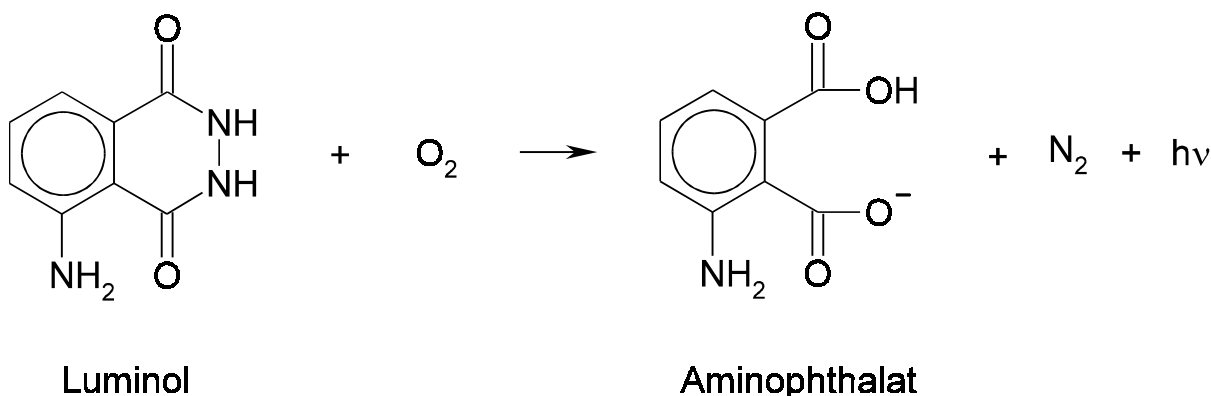
Da die in Chemilumineszenz-Reaktionen entstehenden angeregten Moleküle kurzlebig sind, ist die

Akkumulation eines Reaktionsproduktes - wie beim Nachweis über die photometrischen Methoden - nicht möglich. Deshalb wird von einer Chemilumineszenz-Methode erwartet, daß die Intensität der Lichtemission unter stationären Bedingungen der Bildungsrate nachweisbarer Radikale direkt proportional ist (Kapitel 4.3, Gleichung 23). So würde man im Xanthin/Xanthinoxidase System mit konstanter $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate eine Chemilumineszenz konstanter Intensität erwarten. Im Falle des Lucigenins ist diese Erwartung erfüllt, während die Chemilumineszenzkinetik des Luminols auf nachfolgende Reaktionsschritte oder auf unerwünschte Wechselwirkungen hinweist, die eine quantitative Bestimmung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate mit der Luminol-Methode erschweren können.

Die genauere Analytik der Chemilumineszenzkinetik des Luminols und des Lucigenins hinsichtlich ihrer Aussage für die quantitative sowie qualitative Beurteilung des $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises in dem Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) hat zu folgenden Resultaten geführt.

3.5.1 Untersuchungen zur Chemilumineszenz des Luminols.

Die Reaktion des Luminols, welche von Chemilumineszenz begleitet wird, ist eine Oxidation. Das angeregte Reaktionsprodukt Aminophthalat ist für die Chemilumineszenz verantwortlich. Abgesehen von dem genauen Mechanismus des Chemilumineszenz-Prozesses, das eine Ein-Elektronen-Oxidation sowie eine Ein-Elektronen-Reduktion erfordert, kann die Gesamtreaktion wie folgt geschrieben werden:



Reaktion 19

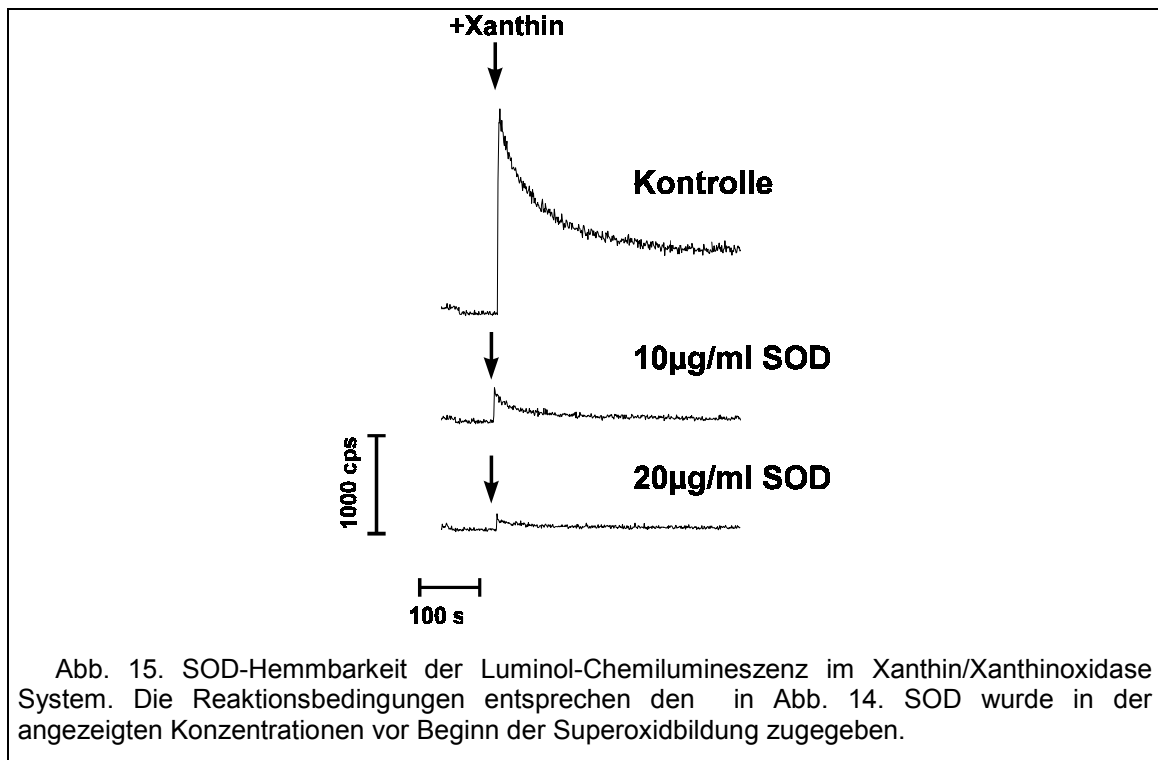
Die Chemilumineszenz des Luminols wurde bei Superoxidbildung im Xanthin/Xanthinoxidase System registriert. Ihre abnehmende Intensität widerspricht jedoch der konstanten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate, von der eine Chemilumineszenz ebenfalls konstanter Intensität erwartet wird. Nachdem keine Veränderungen der charakteristischen pulsartigen Form der Chemilumineszenzkinetik des Luminols bei unterschiedlichen $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten festgestellt wurde, wurden die Ursachen dieser Kinetik analysiert.

Zunächst wurde überprüft, ob die beobachtete Chemilumineszenz $O_2^{\cdot-}$ -abhängig ist.

Dies läßt sich aus der Wirkung von SOD (Kapitel 3.2) auf die Chemilumineszenz-Intensität ableiten. In den angegebenen Konzentrationen (Abb. 15) wurde SOD zum Reaktionsgemisch mit Luminol zugegeben und anschließend die Superoxidbildung durch die Zugabe von Xanthin gestartet. Wie Abb. 15 zeigt, vermag SOD in der Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ die Chemilumineszenz des Luminols zum größten Teil zu hemmen, was auf die Beteiligung von Superoxidradikalen an der Chemilumineszenz hinweist.

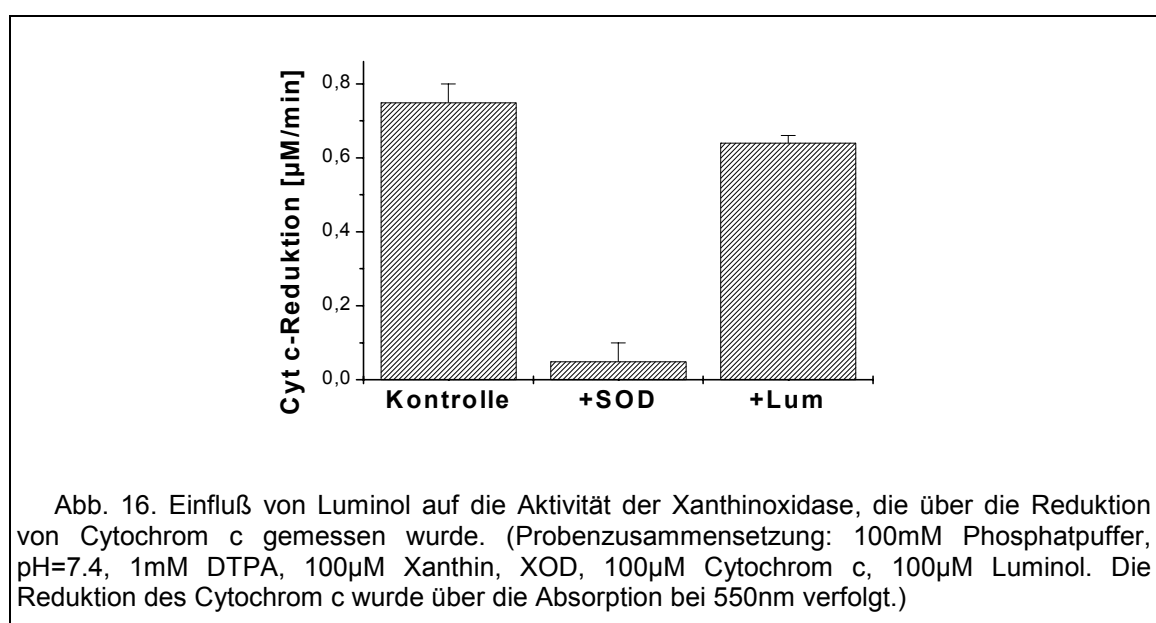
Nach positiver Beantwortung der Frage nach der $O_2^{\cdot-}$ -Abhängigkeit der Luminol-Chemilumineszenz, wurden die ihre Kinetik beeinflussenden Faktoren untersucht.

Eine mögliche Erklärung für die registrierte Kinetik wäre, daß die zugesetzte Menge an Luminol nicht ausreichend für den Nachweis der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate ist und schon innerhalb der ersten Minuten verbraucht wird. Daß das nicht der Fall ist, zeigt die Abb. 17. Man sieht, daß die Zugabe von Luminol zum Reaktionsgemisch nach Abklingen der Chemilumineszenz keine weitere Erhöhung der Chemilumineszenz-Intensität hervorruft. Die Zugabe von weiteren 100 μM Xanthin brachte ebenso keinen Effekt. Daraus kann geschlossen werden, daß die beobachtete Kinetik der Chemilumineszenz nicht durch den Luminol- oder Xanthinverbrauch bedingt ist.



Eine andere Begründung der pulsartigen Kinetik der Chemilumineszenz wäre, daß Luminol oder seine Oxidationsprodukte in eine Wechselwirkung mit dem $O_2^{\cdot-}$ -Bildungssystem treten, indem sie die Aktivität der Xanthinoxidase hemmen.

Angenommen, die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz widerspiegelt die Bildungsrate der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale im Xanthin/Xanthinoxidase System. In diesem Fall sollte nach 3min. Reaktionszeit nur noch ca.15% von der Anfangsaktivität der Xanthinoxidase (im Sinne der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung) nachweisbar sein, da die Intensität der Chemilumineszenz nach 3min Superoxidbildung nur noch 15% vom anfänglichen Intensitätsmaximum beträgt (Abb. 14B). Wenn Luminol für die beobachtete Hemmung verantwortlich wäre, dann wäre die Superoxidbildung durch Xanthinoxidase nach 3min zu 85% gehemmt.

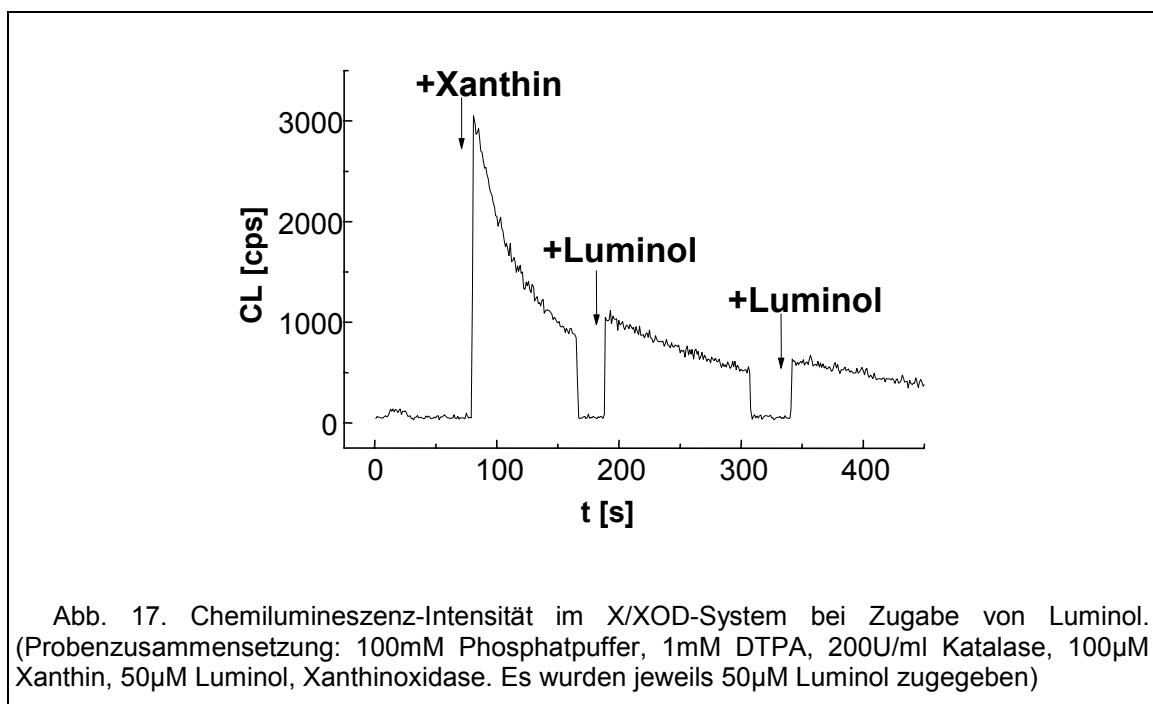


Um zu überprüfen, ob Luminol tatsächlich die Aktivität der Xanthinoxidase erheblich beeinflusst, wurde ein Versuch unternommen, ihre Aktivität spektrophotometrisch über die Harnsäurebildung in An- und Abwesenheit von Luminol zu bestimmen.

Wurden die Messungen bei dem für Harnsäure charakteristischen Absorptionsmaximum bei 290nm durchgeführt, konnte eine langsamere Zunahme der optischen Dichte bei dieser Wellenlänge in Anwesenheit von Luminol festgestellt werden. Die genauere Analyse der Spektren jedoch ergab, daß diese Verlangsamung nicht wegen einer verminderten Harnsäurebildung (durch gehemmte Xanthinoxidase) zustande kommt. Das Spektrum des Luminols überlagert sich im UV-Bereich mit dem Spektrum der Harnsäure, so daß die Oxidation des Luminols und die damit verbundenen Veränderungen seines Spektrums zu einer Verminderung des Anstieges der optischen Dichte bei 290 nm führen und somit eine Abnahme der Harnsäurebildungsrate vortäuschen.

Da eine direkte spektrophotometrische Messung der Xanthinoxidase-Aktivität über die Harnsäurebildung in Anwesenheit des Luminols nicht möglich war, wurde sein Einfluß auf die Superoxidbildung im Xanthin/Xanthinoxidase System indirekt über die Reduktion von Cytochrom c untersucht. Würde Luminol die Xanthinoxidase hemmen, dann wären die Superoxidradikale in einer geringeren Rate produziert worden, was über eine verminderte Reduktionsrate des Cytochrom c in Anwesenheit des Luminols nachweisbar wäre.

Wie man aber aus Abb. 16 sieht, hat Luminol in der für die Chemilumineszenz-Messungen verwendeten Konzentration nur eine geringe hemmende Wirkung auf die Reduktionsrate des Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System. Diese kann auf eine Konkurrenzreaktion zwischen Cytochrom c und Luminol um die Superoxidradikale zurückgeführt werden, was als Begründung für die Abnahme der Chemilumineszenz-Intensität von 85% jedoch nicht ausreichend ist.



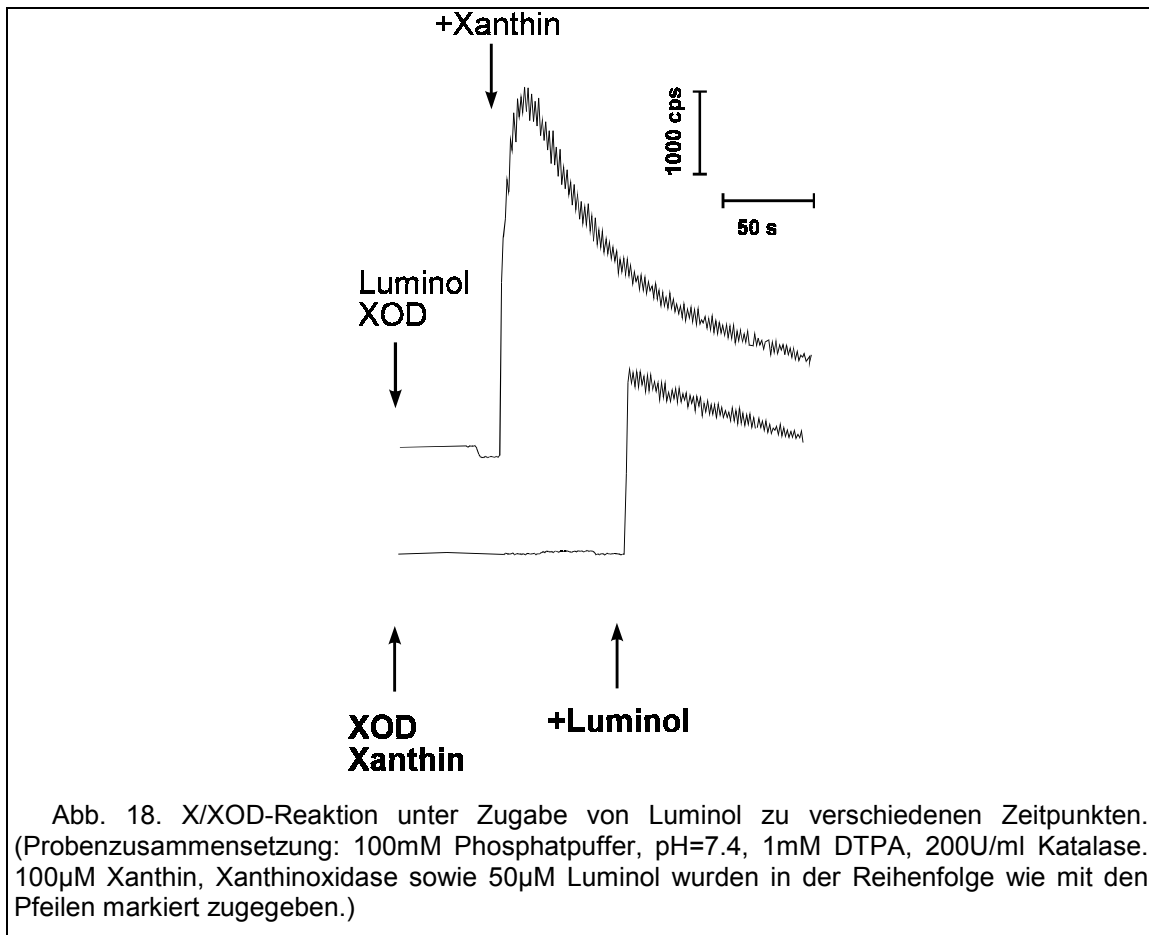


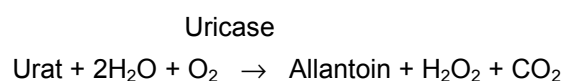
Abb. 18. X/XOD-Reaktion unter Zugabe von Luminol zu verschiedenen Zeitpunkten. (Probenzusammensetzung: 100mM Phosphatpuffer, pH=7.4, 1mM DTPA, 200U/ml Katalase, 100µM Xanthin, Xanthinoxidase sowie 50µM Luminol wurden in der Reihenfolge wie mit den Pfeilen markiert zugegeben.)

Einen zusätzlichen Beweis, daß Xanthinoxidase durch Luminol nicht gehemmt wird, liefern die kinetischen Untersuchungen. Wird die Oxidation des Xanthins durch Xanthinoxidase zunächst in Abwesenheit des Luminols ermöglicht und Luminol erst später zugegeben, dann beobachtet man die Fortsetzung jener Kinetik, die beim Zusatz des Luminols vor Beginn der Reaktion abgelaufen ist (Abb. 18). Somit erweist sich die beobachtete Kinetik der Chemilumineszenz als eine Eigenschaft des Modellsystems selbst, die sich unabhängig von der Anwesenheit des Luminols im Laufe der enzymatischen Reaktion entwickelt.

Die Wechselwirkungen mit dem Modellsystem könnten in der Auslöschung der Chemilumineszenz durch eine Reaktion zwischen Luminol bzw. seinen intermediären Oxidationsprodukten und der Harnsäure bestehen, welche im X/XOD-System als Oxidationsprodukt von Xanthin parallel zu Superoxid gebildet wird (Kapitel 3.1).

Um zu überprüfen, ob die Harnsäure tatsächlich die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz beeinflusst, wurde sie vor Beginn der Superoxidbildung zum Modellsystem zugegeben. Die Konzentration der Harnsäure wurde so gewählt, daß diese der nach 5 Minuten durch Xanthin/Xanthinoxidase gebildeten Harnsäure entsprach.

Wie Abb. 19 zeigt, ist die Luminol-Chemilumineszenz tatsächlich durch die Harnsäure bis zu dem Niveau gehemmt worden, welches nach 5 Minuten Reaktionszeit im Xanthin/Xanthinoxidase System beobachtet wurde. Die Abnahme der Chemilumineszenz-Intensität, die bei Zugabe der Harnsäure beobachtet wurde, konnte jedoch nicht durch den Zusatz des Enzyms Uricase, welche Harnsäure oxidiert (Gleichung 11), verhindert werden (Abb. 19).



Gleichung 11

Ebenso konnte Uricase - unabhängig davon, ob sie vor oder während der Reaktion zugegeben wurde, die abrupte Abnahme der Lichtintensität im Xanthin/Xanthinoxidase System nicht beeinflussen.

Die mangelnde Beseitigung des beobachteten Hemmeffektes der Harnsäure auf die Chemilumineszenz des Luminols durch Uricase kann durch eine Wechselwirkung des Enzyms mit dem Xanthin/Xanthinoxidase System bedingt sein. Xanthin, das im Reaktionsgemisch vorhanden ist, kann Uricase nach einem Konkurrenzmechanismus hemmen und seine Konzentration von 100µM ist ausreichend, um die Aktivität dieses Enzyms erheblich zu reduzieren, da die Inhibitor konstante der Uricase mit Xanthin 23µM beträgt [1].

Somit wurde die im Xanthin/Xanthinoxidase System gebildete Harnsäure als verantwortlich für die Löschung der Chemilumineszenz des Luminols betrachtet. Welche Eigenschaften der Harnsäure den beobachteten Effekt bedingen, wird weiter in diesem Kapitel untersucht.

Da die Harnsäure mit Superoxidradikalen äußerst langsam reagiert, kann hier der Hemmeffekt durch eine Desaktivierung von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen nicht erklärt werden. Die Komplexbildung von Übergangsmetallen, vor allem von Eisen, sowie das Abfangen von Hydroxylradikalen sind hingegen die allgemein akzeptierten Mechanismen der antioxidativen Wirkung von Harnsäure. Da die Bildung von Hydroxylradikalen in einem $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden System ebenfalls durch Übergangsmetalle katalysiert wird (Reaktion 12), entsteht die Frage, ob die hemmende Wirkung der Harnsäure auf die Luminol-Chemilumineszenz aus ihrer Eigenschaft, Übergangsmetalle zu komplexieren, resultiert.

Obwohl freies Eisen im Modellsystem durch DTPA (1mM) komplexiert ist, bleibt ein Teil des Eisens als Folge des dynamischen Gleichgewichtes zwischen komplexierter und freier Form ungebunden. Die bei der Oxidation des Xanthins gebildete Harnsäure kann zur Komplexbildung des ungebundenen Eisens beitragen und dadurch die Konzentration der freien Form weiter senken. Wenn die hemmende Wirkung der Harnsäure auf die Intensität der Chemilumineszenz durch eine Verminderung der Konzentration ungebundener Übergangsmetalle geschieht, dann sollten auch die anderen Vorgänge, die diese Verminderung beinhalten, dieselbe Auswirkung auf die Chemilumineszenz haben.

Die Hauptquelle möglicher Eisenverunreinigungen in unserem Modellsystem sind die in den Puffern eingesetzten Phosphatsalze. Mit der Senkung der Puffermolarität sinkt auch die Konzentration möglicher Verunreinigungen an Übergangsmetallen. Bei der gleichen Konzentration von DTPA wird dadurch das Verhältnis DTPA/Fe erhöht, so daß der Anteil von ungebundenem Eisen geringer wird, was nach der oben entwickelten Hypothese eine Luminol-Chemilumineszenz geringerer Intensität zur Folge haben muß.

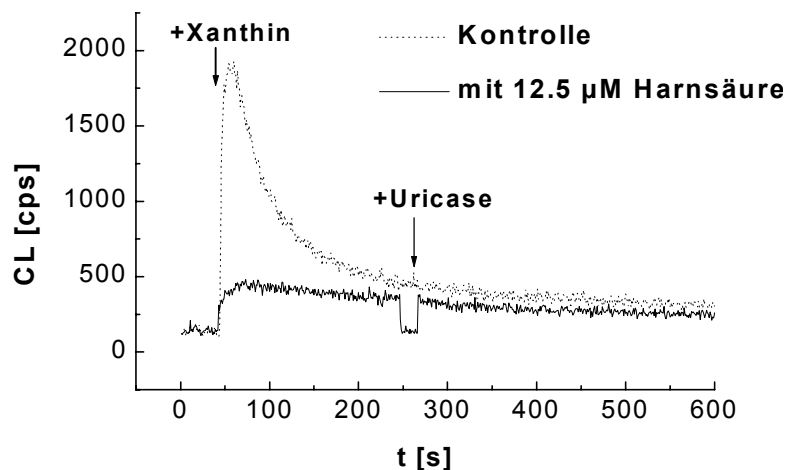


Abb. 19. Einfluß der Harnsäure auf die Chemilumineszenz des Luminols im Xanthin/Xanthinoxidase System. Die Bedingungen für die Kontrolle sind wie in Abb. 14 angegeben. 12.5µM Harnsäure wurde vor dem Beginn der Superoxidbildung zu dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die Konzentration von Uricase betrug 2mU/ml.

Ob die Konzentration des ungebundenen Eisens tatsächlich einen Einfluß auf die Chemilumineszenz des Luminols im Xanthin/Xanthinoxidase System hat, wurde in den folgenden Experimenten überprüft. Um einen stabilen pH-Wert zu gewährleisten, wurden die bisher beschriebenen Chemilumineszenz-Messungen mit Luminol in 100mM Phosphatpuffer mit 1mM DTPA durchgeführt. Die Chemilumineszenz des Luminols konnte in diesem Puffer unabhängig davon registriert werden, ob DTPA in der Probe vorhanden war oder nicht.

Um die Konzentration des freien Eisens zu senken, wurde die Puffermolarität von 100mM auf 10mM Phosphat (PBS) reduziert, die Konzentration von DTPA (1mM) sowie der pH-Wert (pH=7.4) blieben hierbei unverändert. Wie in Abb. 20 deutlich wird, konnte die Chemilumineszenz des Luminols im 10mM Phosphatpuffer (PBS) durch Anwesenheit von 1mM DTPA gehemmt werden. Dies bestätigt die Hypothese der Beteiligung von ungebundenen Übergangsmetallen in sehr geringen Konzentrationen an der Entwicklung der Chemilumineszenz des Luminols.

Die Untersuchungen zur Chemilumineszenz des Luminols im Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) ergaben, daß obwohl diese mit SOD hemmbar ist, sie nicht ausschließlich durch die Bildungsrate der Superoxidradikale bestimmt ist. Die Chemilumineszenz wird durch Spurenkonzentrationen von Übergangsmetallen wesentlich beeinflusst, so daß ein quantitativer Nachweis von Superoxidradikalen mit dieser Methode unmöglich erscheint.

3.5.2 Chemilumineszenz des Lucigenins.

Lucigenin, bis-N-Methylacridiniumnitrat, wird als eine $O_2^{\cdot-}$ -spezifische Lumineszenzprobe angesehen. Die Reaktion des Lucigenins, die durch Chemilumineszenz begleitet wird, ist eine reduktive Oxygenierung (Reaktion 20). Außer einem Sauerstoffmolekül werden noch zwei Elektronen für die Bildung des lumineszierenden Produktes N-Methylacridon benötigt, so daß die Gesamtreaktion wie folgt geschrieben werden kann [5]:

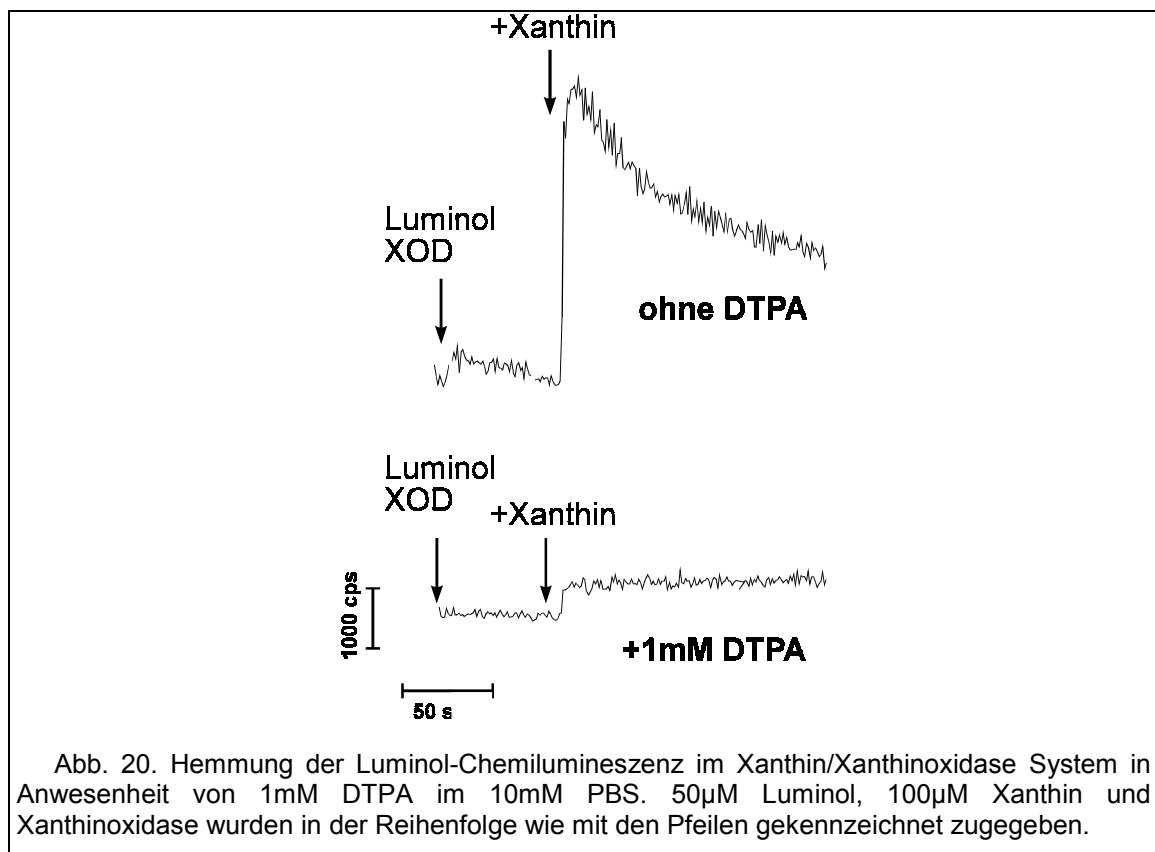
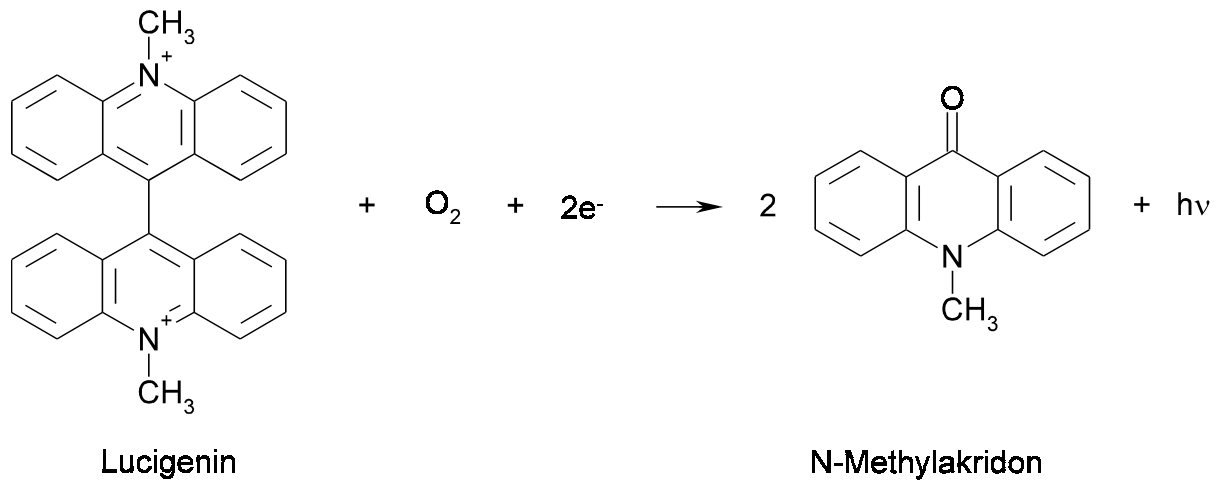
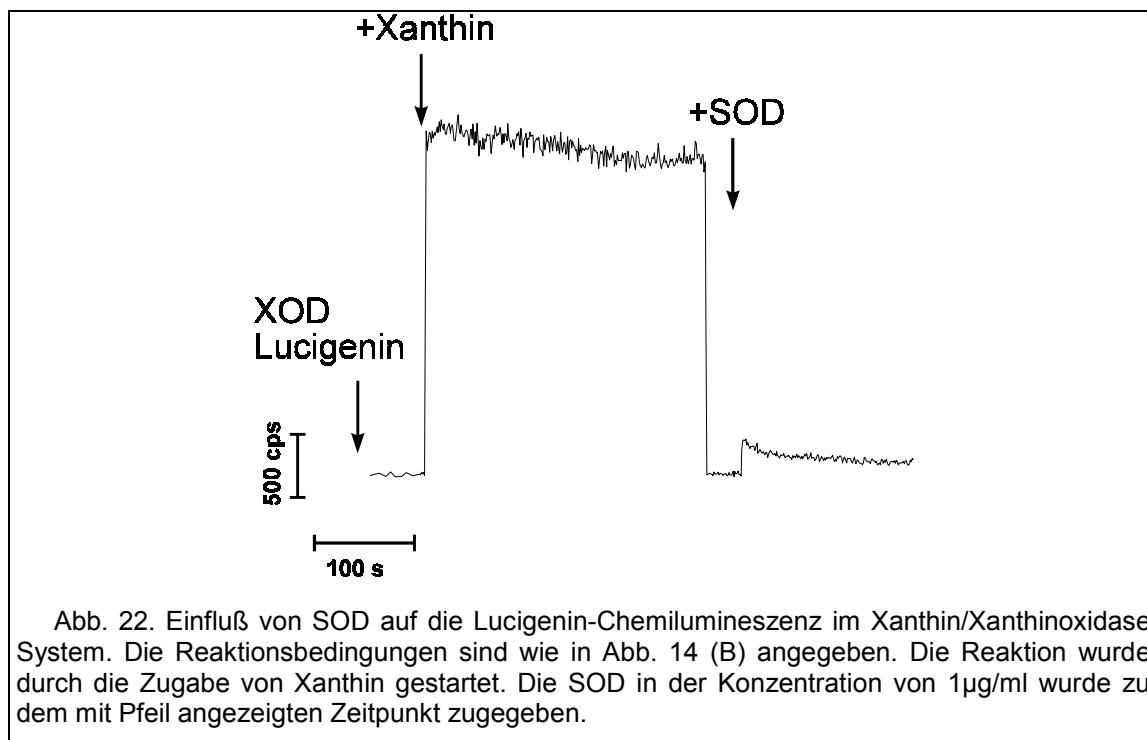


Abb. 20. Hemmung der Luminol-Chemilumineszenz im Xanthin/Xanthinoxidase System in Anwesenheit von 1mM DTPA im 10mM PBS. 50µM Luminol, 100µM Xanthin und Xanthinoxidase wurden in der Reihenfolge wie mit den Pfeilen gekennzeichnet zugegeben.



Reaktion 20

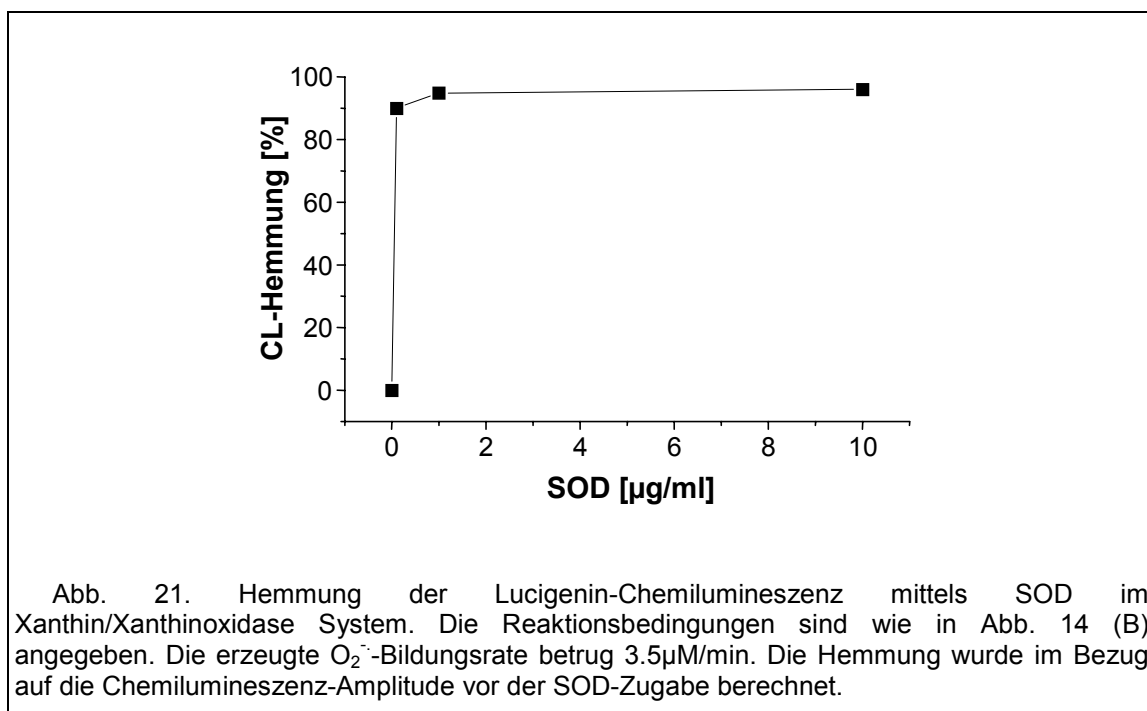
Wurde die $\text{O}_2^{\cdot -}$ -Bildung im Xanthin/Xanthinoxidase System in Anwesenheit von Lucigenin in Gang gesetzt, dann konnte eine Chemilumineszenz registriert werden. Eine typische Chemilumineszenzkinetik ist in Abb. 22 dargestellt.

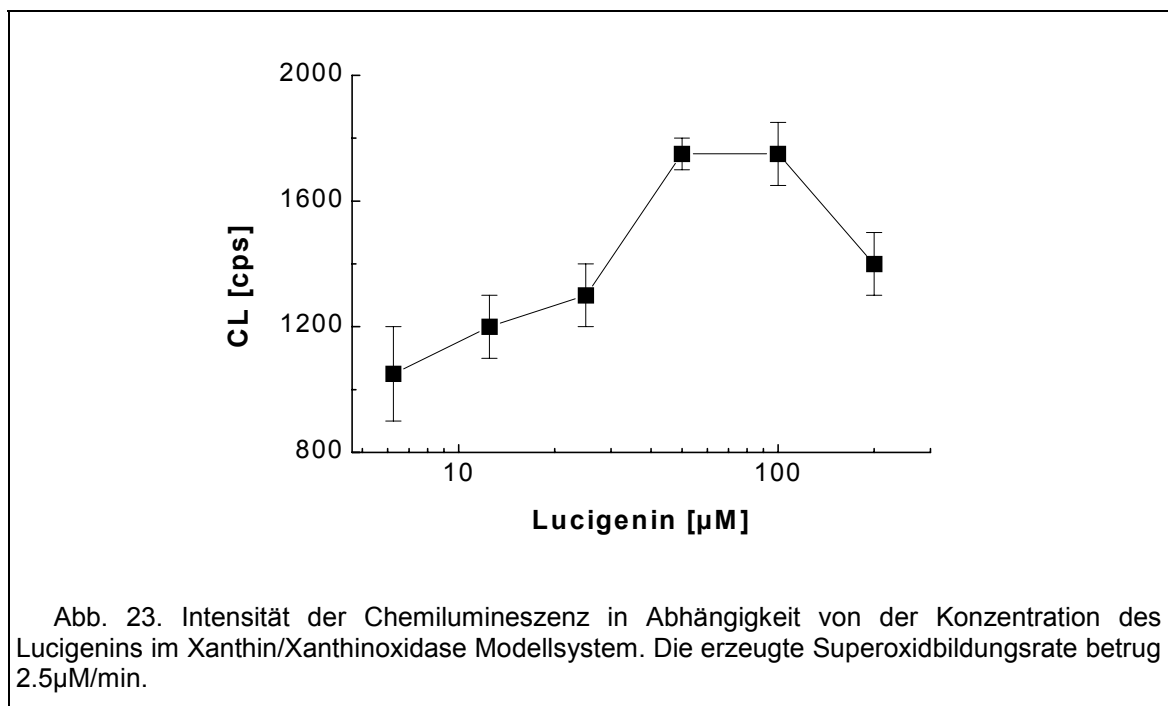


Um den Beitrag von Superoxidradikalen zur Chemilumineszenz des Lucigenins zu klären, wurde die Löschung mittels SOD untersucht (Kapitel 3.2).

Wie in Abb. 22 dargestellt, nimmt die Intensität der Chemilumineszenz nach Zugabe von SOD drastisch ab. Kurz nach der Zugabe von SOD wird ein neues stationäres Niveau der Chemilumineszenz erreicht, das für die Berechnung der Hemmung durch unterschiedliche Konzentrationen von SOD diente. Die Amplitude der Chemilumineszenz nach Zugabe von SOD wurde bei einer konstanten Superoxid-Bildungsrate in Abhängigkeit von der SOD-Konzentration untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 21 dargestellt. Die Hemmung wurde prozentual in





Bezug auf die Amplitude ungehemmter Chemilumineszenz berechnet. Wie aus Abb. 21 ersichtlich, strebt die SOD-Hemmung der Lucigenin-Chemilumineszenz asymptotisch auf den 100%-Wert zu, was auf die Beteiligung von Superoxidradikalen in dieser Chemilumineszenz-Reaktion hinweist.

Für die weiteren Untersuchungen sollte die optimale Konzentration des Lucigenins ermittelt werden, welche die maximale Intensität gewährleistet. Hierfür wurde die Superoxidbildungsrate konstant gehalten, die Konzentration des Lucigenins variiert und die Chemilumineszenz gemessen.

Die Veränderung der Konzentration von Lucigenin zwischen 1 und 200μM bei einer konstanten Superoxidbildungsrate hatte keinen Einfluß auf die Kinetik der registrierten Chemilumineszenzkurve, die Amplitude des stationären Niveaus wies jedoch eine glockenförmige Abhängigkeit von der Konzentration des Lucigenins auf (Abb. 23).

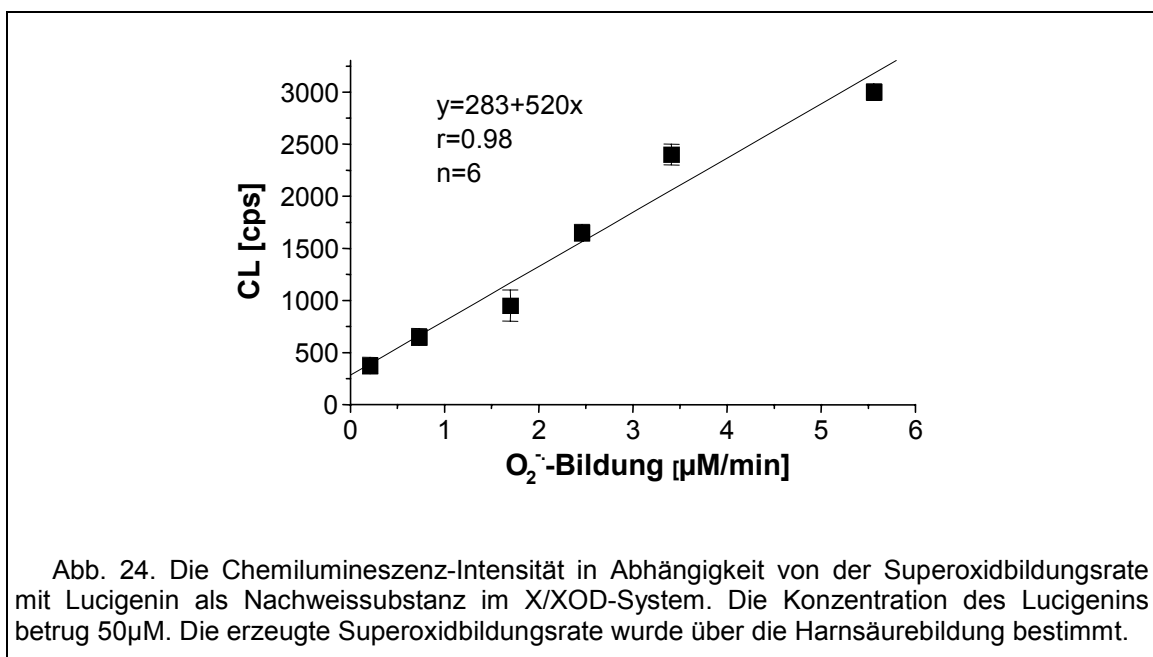
Bei niedrigeren Konzentrationen des Lucigenins (unter 50μM) nimmt die Intensität der Chemilumineszenz mit der Erhöhung der Konzentration zu. Ab 100μM Lucigenin tritt jedoch eine Hemmung der Chemilumineszenz auf, die durch Reabsorption des emittierten Lichtes erklärt werden kann, da die Lösung bei der Konzentration des Lucigenins ab 100μM intensiv gelb gefärbt ist. Daher wurde die Konzentration des Lucigenins im Bereich zwischen 50 und 100μM als optimal für die Chemilumineszenz-Messungen gefunden.

Nach der Feststellung der Wirksamkeit von SOD sowie der optimalen Konzentration des Lucigenins für den Superoxidnachweis wurde die Abhängigkeit der Chemilumineszenz-Intensität von der Superoxidbildungsrate untersucht. Die produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde spektrophotometrisch über die Harnsäurebildung unter den gleichen Bedingungen, aber ohne Lucigenin, bestimmt (Kapitel 3.1, Gleichung 3).

Wie in Abb. 24 dargestellt, weist die Chemilumineszenz-Intensität in dem untersuchten Bereich eine Abhängigkeit von der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate auf, die mit guter Genauigkeit linear approximiert werden konnte ($r=0.98$). Die Approximation geht nicht durch den Nullpunkt. Der Schnittpunkt mit der Ordinate gibt das Grundrauschen des Photomultipliers an.

Interessanterweise konnte die Amplitude der Lucigenin-Chemilumineszenz im Xanthin/Xanthinoxidase System auch durch eine Zugabe von Albumin (Endkonzentrationen 0.25 und 0.5 mg/ml) um 58% bzw. 86% erhöht werden (bei einer Superoxidbildungsrate von $5.7\mu\text{M}/\text{min}$). Der Zusatz von Albumin hatte keinen Einfluß auf die Hemmbarkeit der Chemilumineszenz durch SOD, was auf die immer noch bestehende Superoxidabhängigkeit der zur Chemilumineszenz führenden Reaktion hinweist. Die beobachtete Erhöhung der Intensität konnte nicht durch eine Zunahme der Aktivität der Xanthinoxidase zurückgeführt werden, wenn diese über die Reduktion von Cytochrom c kontrolliert wurde. Daher scheint Albumin die Quantenausbeute der Chemilumineszenzreaktion zu beeinflussen, indem es Lucigenin bindet und dadurch die strahlungslose Dissipation von Energie reduziert. Da Albumin bei der Untersuchung biologischer Objekte häufig als ein Bestandteil des Puffers vorhanden ist, kann es leicht zu verfälschten quantitativen Aussagen über die Superoxidbildungsrate kommen.

Die Analyse der Chemilumineszenz des Lucigenins im Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystem ergab, daß die Intensität der Chemilumineszenz unter bestimmten Bedingungen als Maß der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate dienen kann. Eine erhöhte Intensität muß jedoch nicht unbedingt eine höhere Superoxidbildungsrate anzeigen, vor allem dann nicht, wenn die Quantenausbeute der Chemilumineszenz des Lucigenins durch andere Faktoren, wie oben diskutiert, beeinflusst wird.



3.6 ESR-Spintrapping zum Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale.

Elektronenspinresonanz ist eine Methode zum Nachweis paramagnetischer Spezies (Meßprinzip s. Kapitel 2.2). Da das Superoxidradikal ein ungepaartes Elektron besitzt, läßt sich das Signal des paramagnetischen Superoxides mit Hilfe der ESR-Methode unter bestimmten Bedingungen direkt nachweisen. Dies erfordert jedoch Bedingungen, unter denen die $O_2^{\cdot-}$ -Radikale stabilisiert sind. Eine Stabilisierung ist beispielsweise durch eine Kombination des alkalischen pH-Wertes mit der Phasenstabilisierung bei Tieftemperaturen (77 K) möglich [51], da hierdurch die Disproportionierung von Superoxidradikalen zurückgedrängt wird. Praktisch sind diese Voraussetzungen in biologischen Systemen schwer zu verwirklichen, so daß ein direkter paramagnetischer Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale nur begrenzt möglich ist.

Mit der Anwendung von Spintraps, d.h. Verbindungen, die mit Radikalen unter Bildung von mit ESR nachweisbaren Addukten reagieren, ist es hingegen möglich, auch bei Raumtemperatur den Nachweis der Existenz von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen zu führen [35,49]. Durch Bildung eines Superoxid-Adduktes mit einem geeigneten $O_2^{\cdot-}$ -Radikalfänger wie DMPO wurde die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion an biologischen Objekten nachgewiesen [145,152]. Von Nachteil ist meist die geringe Stabilität des gebildeten Adduktes sowie eine niedrige Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen dem Spintrap und Superoxidradikal. Dies erfordert den Einsatz hoher Konzentrationen des Spintraps, was in biologischen Systemen zu unerwünschten toxischen Wirkungen führen kann [145].

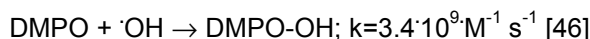
Zwei Spintrapps, das am häufigsten eingesetzte DMPO und sein neues Derivat, DEPMPO, werden in diesem Kapitel hinsichtlich ihrer Möglichkeiten des quantitativen und qualitativen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises in dem Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase untersucht.

3.6.1 DMPO.

5,5-Dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO, Abb. 25) ist ein Spintrap, der mit Superoxid - sowie mit Hydroxyl - Radikalen reagiert (Reaktion 21 bzw. Reaktion 22):



Reaktion 21



Reaktion 22

Der 1-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von DMPO beträgt 0.093 [120], so daß in biologischen Systemen DMPO hauptsächlich in polarer Umgebung (wäßrige Phase) konzentriert ist. Die niedrige Geschwindigkeitskonstante des Spintrap mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen bei physiologisch relevantem pH=7.4 ($k=10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, [46]) erfordert den Einsatz von hohen DMPO-Konzentrationen, wenn die konkurrierende Dismutationsreaktion vernachlässigbar werden soll.

Die gebildeten DMPO-OH bzw. DMPO-OOH Addukte lassen sich über ihre charakteristischen ESR-Spektren identifizieren. Die Halbwertszeit des DMPO-OOH Adduktes beträgt ca. 50 s (pH=7.4, 25°C), wobei das Produkt entweder weiter mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen reagiert (Reaktion 23) [32] oder zum DMPO-OH

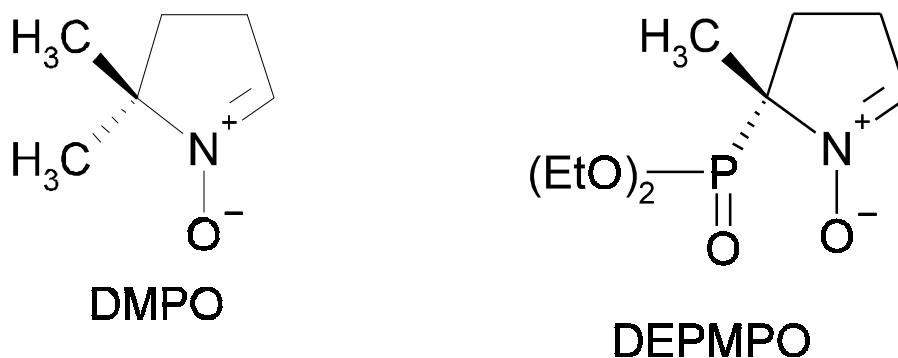
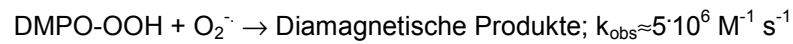


Abb. 25. Chemische Struktur von DMPO und von DEPMPO.

-Addukt zerfällt (Reaktion 24) [46,47]:



Reaktion 23

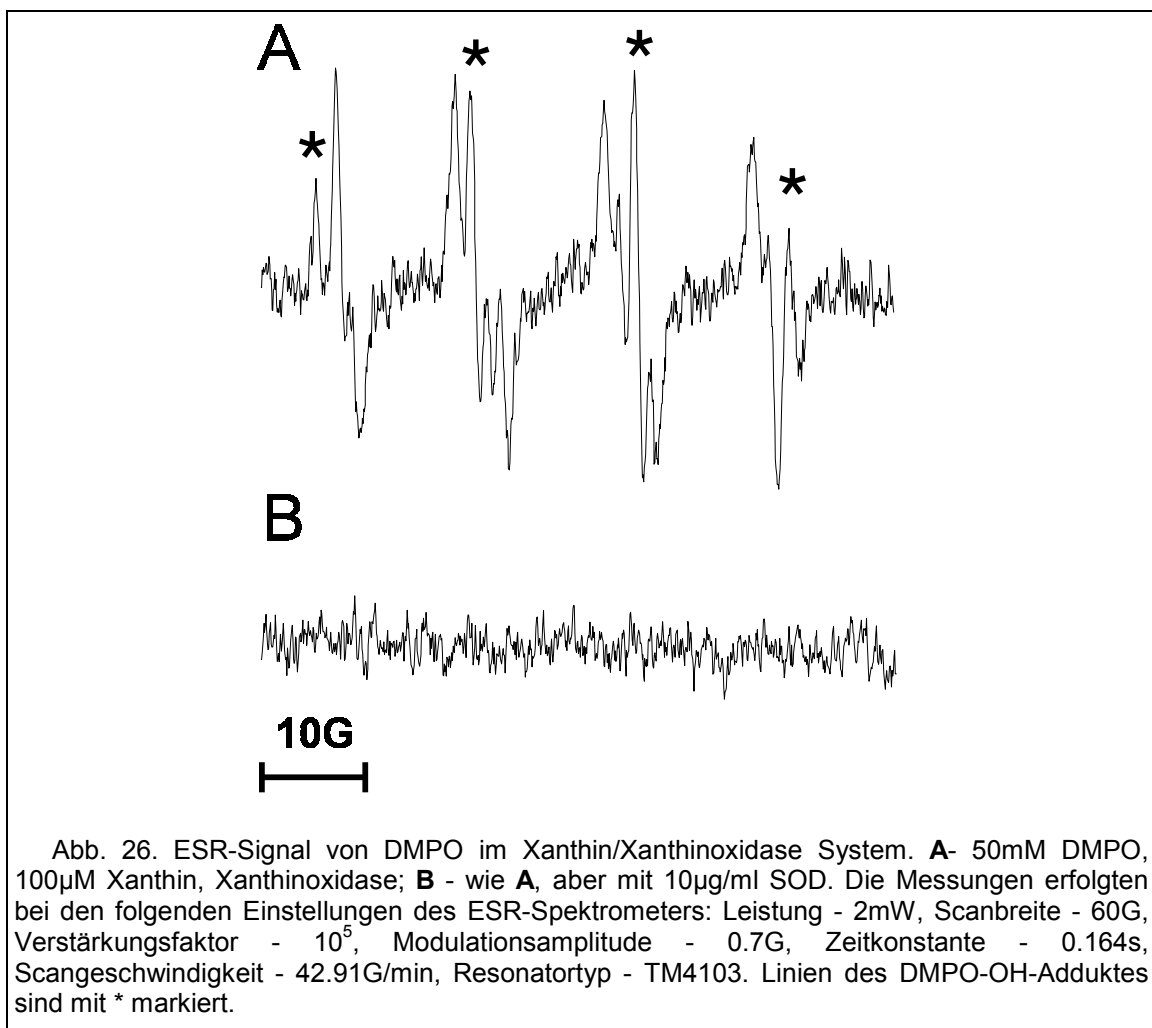


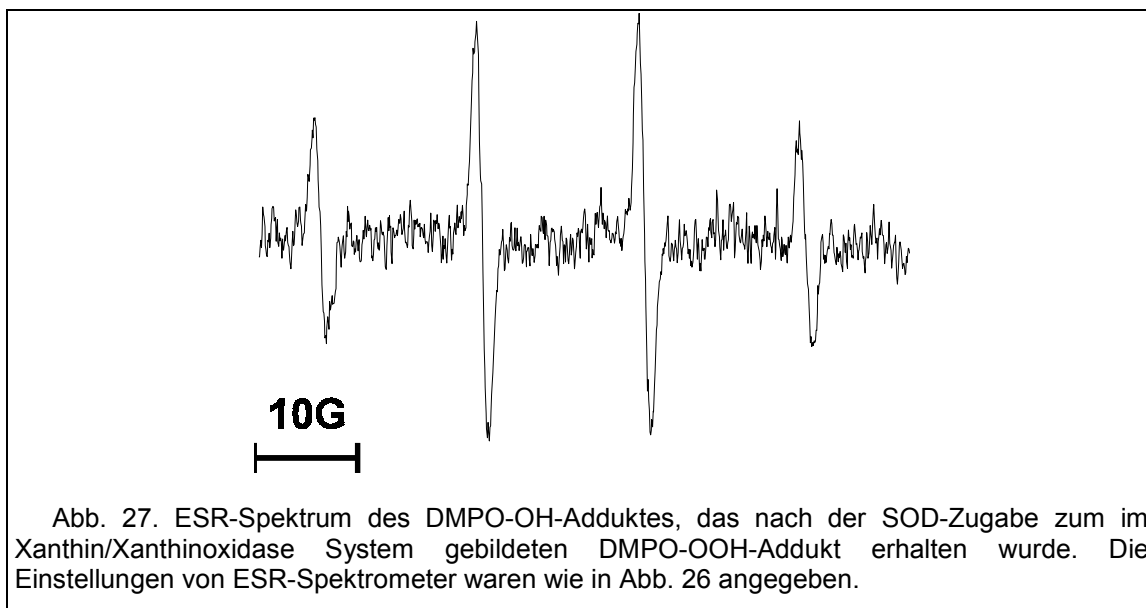
Reaktion 24

Das gebildete DMPO-OH-Addukt kann ebenfalls durch eine Reaktion mit $\text{O}_2^{\cdot -}$ -Radikalen in diamagnetische Produkte umgewandelt werden [123].

Für den Nachweis der über das Xanthin/Xanthinoxidase System gebildeten Superoxidradikale ist eine DMPO-Konzentration von mindestens 50mM erforderlich, um die Spontandismutation vernachlässigen zu können, wie es sich aus Gleichung 9 errechnen läßt ($\alpha \ll 1$). Aus diesem Grund wurden alle ESR-Messungen beim Einsatz von DMPO-Konzentration $\geq 50\text{mM}$ durchgeführt.

Wurde die Superoxidbildung in Anwesenheit von DMPO in Gang gesetzt, dann wurde ein charakteristisches ESR-Signal beobachtet.





In Abb. 26A ist das ESR-Spektrum dargestellt, das in Anwesenheit des Radikalfängers DMPO erhalten wurde, wenn Xanthin/Xanthinoxidase als $O_2^{\cdot-}$ -Generierungssystem eingesetzt wurde. Die im System produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde aus der Harnsäurebildungsrate errechnet (Kapitel 3.1, Gleichung 3).

Die Analyse des Spektrums ergab, daß es sich um ein Mischspektrum aus DMPO-OOH und DMPO-OH-Addukten handelt (Abb. 26A).

Wenn das $O_2^{\cdot-}$ -dismutierende Enzym SOD vor dem Beginn der Superoxidbildung unter den identischen Bedingungen wie für das Spektrum A (Abb. 26) zu der Reaktionsmischung zugegeben wurde, konnten keine ESR-Signale registriert werden (Abb. 26B). Dies kann als Beweis dafür gelten, daß die zuvor erhaltenen Signale des DMPO-OOH sowie des DMPO-OH -Adduktes durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale bedingt waren.

Der Effekt von SOD-Zugabe auf die Mischung der im Laufe der Reaktion gebildeten Addukte wurde ebenfalls untersucht. Dies war für einen Vergleich der Stabilität des DMPO-OOH -Adduktes unter den experimentellen Reaktionsbedingungen mit den publizierten Daten notwendig. Wenn SOD während der Reaktion zugegeben wurde, sollte sie die weitere Bildung des DMPO-OOH-Adduktes im Xanthin/Xanthinoxidase System verhindern, so daß die Zerfallskinetik des Adduktes aufgenommen werden kann.

Hierzu wurde das DMPO-OOH -Addukt im Xanthin/Xanthinoxidase System in den sicher detektierbaren Mengen produziert. Nach Aufnahme der ESR-Spektren wurde die Reaktionsmischung aus der Meßzelle herausgenommen, SOD in der Konzentration $10\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und die Probe erneut der ESR-Messung zugeführt. Das Signal, das auf diese Weise erhalten wurde (Abb. 27), hatte die Charakteristik eines DMPO-OH-Adduktes, ohne daß die Absorptionslinien des Superoxid-Adduktes detektierbar waren. Da die für die SOD-Zugabe notwendige Zeit 2min betrug, wird die Halbwertszeit des Superoxid-Adduktes in unserem Modellsystem mit $\leq 1\text{min}$ eingeschätzt.

Das am Computer simulierte Spektrum des nach der SOD-Zugabe erhaltenen Adduktes ist in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Signal, wenn folgende Parameter gewählt werden: $a_N=15.01\text{G}$, $a_H=14.78\text{G}$, Linienbreite 1.20G . Die Simulation erfolgte wie in Kapitel 2.2 angegeben. Das DMPO-OH- Signal mit den gleichen Aufspaltungskonstanten wurde in dem experimentellen Puffer erhalten, wenn DMPO in Kontakt mit einem Hydroxylradikale generierenden System (Fenton-System) gebracht wurde.

Das nach der Zugabe von SOD gebildete DMPO-OH-Addukt blieb innerhalb der Meßzeit (20min.) stabil. Das im Modellsystem vorhandene DMPO-OH-Addukt ist mit Beteiligung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale gebildet worden, da SOD die Bildung von beiden Addukten verhindern konnte.

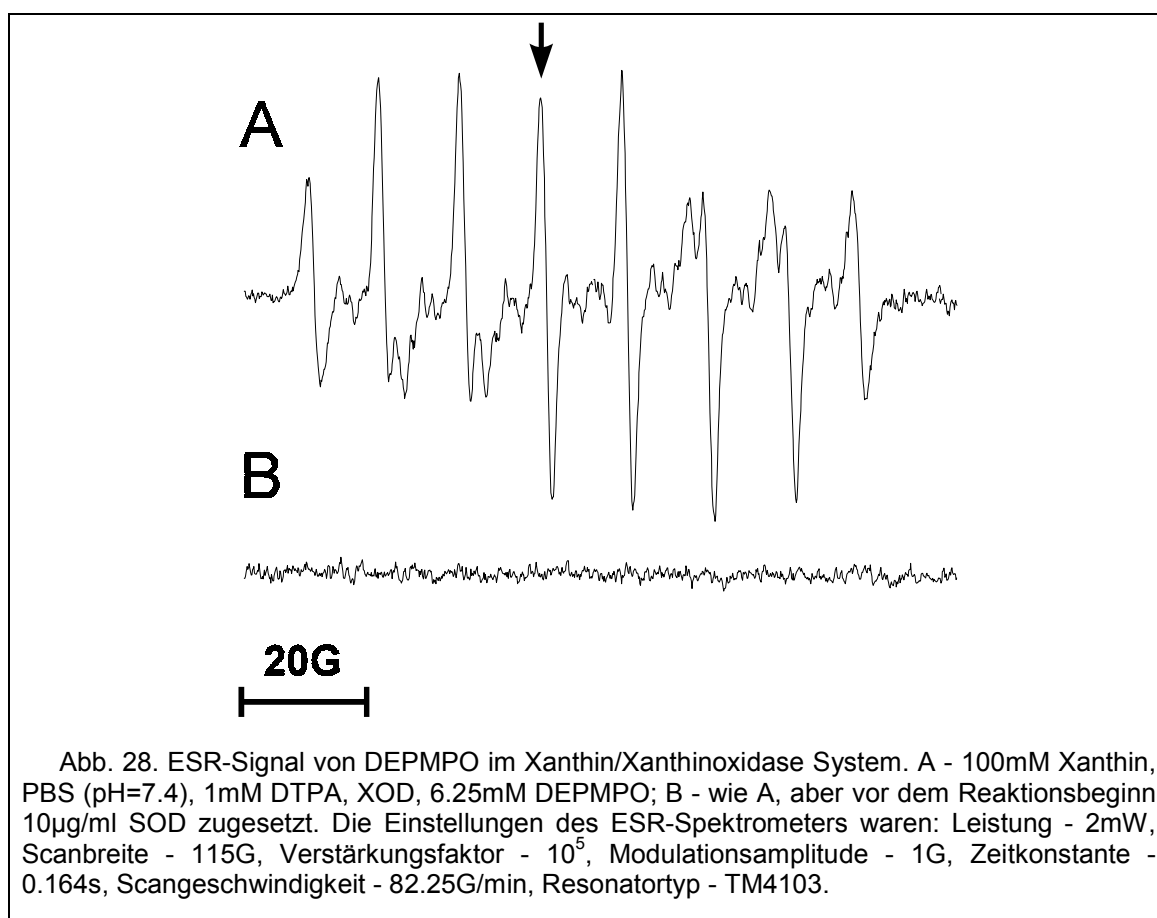
Die kinetischen Untersuchungen der DMPO-OOH-Adduktbildung ergaben, daß das $O_2^{\cdot-}$ -bezogene ESR-Signal mit dem Start der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch das Xanthin/Xanthinoxidase entsteht und auf einem stationären Niveau bleibt, während die Superoxidradikale mit einer konstanten Geschwindigkeit weiter produziert werden. Größeren Superoxidbildungsraten entsprachen jeweils höhere (Anfangs)Amplituden der Signale. Eine quantitative Auswertung von ESR-Signalen wurde wegen der Überlagerung von ESR-Spektren der Hydroxyl- und Superoxid-Addukte erschwert.

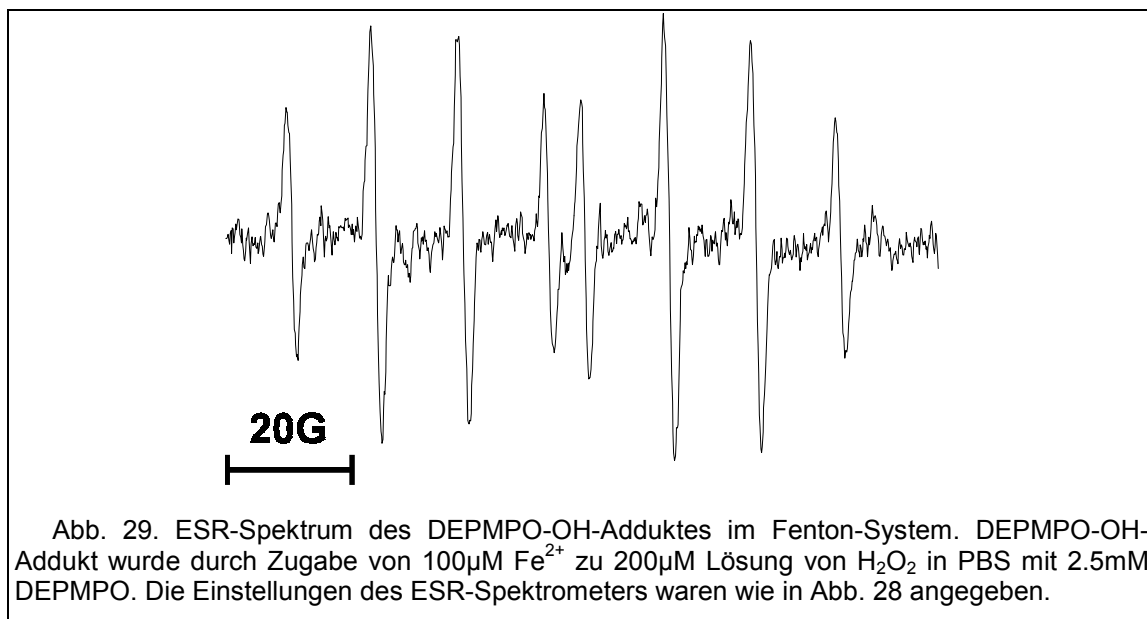
Ein Vorteil der Spintrapping-Methode mit DMPO für den Nachweis von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen besteht darin, daß ein DMPO-OOH-Addukt mit charakteristischem ESR-Spektrum gebildet wird, welches sich deutlich von den anderen DMPO-Addukten unterscheidet. Da aber das DMPO-Superoxid-Addukt in das DMPO-Hydroxyl-Addukt zerfällt, ist es schwer zu beurteilen, ob das zu untersuchende System selbst Hydroxylradikale bildet oder ob das Hydroxyladdukt nur als Zerfallsprodukt des Superoxidadduktes anzusehen ist. Eine Akkumulation des DMPO-OOH-Adduktes ist wegen der kurzen Halbwertszeit bei physiologisch relevanten Superoxidbildungsraten nicht zu erwarten. Kinetische Aspekte, die im Kapitel 4.4 diskutiert werden, tragen ebenso zu den Problemen des quantitativen Nachweises bei.

3.6.2 Phosphoryliertes DMPO (DEPMPO).

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, durch Derivatisierung von DMPO seine Anwendbarkeit zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis zu verbessern. Die Positionen 2-, 3-, 4- und 5- wurden durch verschiedene funktionale Gruppen substituiert. Derivate wie 2-phenyl-5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid, 3-methyl-, 4-hydroxymethyl-DMPO sowie 5-methyl-5-phenylpyrrolin-1-oxid [124] sind in der Literatur beschrieben worden.

Dem Ziel, $O_2^{\cdot-}$ -Radikale quantitativ nachzuweisen, kommen phosphorylierte DMPO-Derivate deutlich näher. So hat phosphoryliertes DMPO, 5-(Diethoxyphosphryl)-5-methyl-1pyrrolin-N-oxid, (Abb. 25) eine Geschwindigkeitskonstante der Adduktbildung mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen von gleicher Größenordnung wie DMPO, die Stabilität des entsprechenden Adduktes ist allerdings ca. 15mal größer [49]. Der 1-





Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient für DEPMPO ist mit 0.06 [49] dem des DMPO sehr ähnlich und bedingt somit den Radikalnachweis hauptsächlich in wässriger Phase.

Wurde die Oxidation des Xanthins durch Xanthinoxidase in Anwesenheit des phosphorylierten DMPO (DEPMPO) durchgeführt, dann konnte man das in Abb. 28A dargestellte ESR-Signal beobachten. Das Signal war vollkommen mit SOD hemmbar (Abb. 28B) und stimmte mit den publizierten ESR-Spektren des DEPMPO-OOH Adduktes überein [49].

Da das DEPMPO-OOH-Addukt eine höhere Stabilität im Vergleich zum DMPO-OOH-Addukt aufweist, läßt sich das ESR-Signal auch bei einer ca.10-fach geringeren DEPMPO-Konzentration erfassen (50mM DMPO gegen 6.25mM DEPMPO im Test).

In Analogie zum DMPO wurde auch mit DEPMPO neben dem Superoxid-Addukt die Bildung eines Hydroxyl-Adduktes im Xanthin/Xanthinoxidase System nicht ausgeschlossen. Das Vergleichsspektrum des letzteren wurde nach der Inkubation von DEPMPO mit Fenton-Reagenzien aufgenommen (Abb. 29). Das Spektrum des DEPMPO-OH-Adduktes unterscheidet sich deutlich von dem des DEPMPO-OOH, was eine Differenzierung zwischen beiden Sauerstoffspezies mit diesem neuen Spintrap ermöglicht.

Wie aus Abb. 28 ersichtlich, wurde keine signifikante Menge an DEPMPO-OH-Addukt beim DEPMPO-Spintrapping im Xanthin/Xanthinoxidase System registriert.

Das ESR-Signal des DEPMPO-OH-Adduktes läßt sich über ein Computerprogramm simulieren (Kapitel 2.2), wenn die folgenden Parameter berücksichtigt werden: Aufspaltungskonstanten $a_H=13.34G$, $a_N=14.02G$, $a_P=47.15G$; Linienbreite 1.2G.

Die Stabilität des gebildeten DEPMPO-OOH-Adduktes in dem Modellsystem wurde wie folgt untersucht. Die Superoxidbildung wurde über das Xanthin/Xanthinoxidase System unter Zugabe von DEPMPO gestartet. Nachdem eine sicher detektierbare Menge des Adduktes gebildet war, wurde das Reaktionsgemisch aus der ESR-Meßzelle herausgenommen und SOD in der Konzentration 10µg/ml zugesetzt, um die weitere Bildung des DEPMPO-OOH-Adduktes zu blockieren. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zurück in die Meßzelle gegeben und die Zerfallskinetik des Adduktes aufgenommen (Abb. 30).

Nach Zugabe von SOD nimmt die Signalintensität des DEPMPO-OOH-Adduktes ab, ohne daß es dabei zur Bildung von detektierbaren Mengen anderer paramagnetischer Produkte kommt. Für die Bestimmung der Halbwertszeit des DEPMPO-OOH-Adduktes wurde das Magnetfeld auf ein Maximum des mittleren Duplets (mit dem Pfeil auf der Abb. 28 markiert) eingestellt und die Amplitude des Signals verfolgt (Abb. 30).

Wird die Zerfallskinetik einfach exponentiell als Reaktion pseudo-erster Ordnung approximiert, so ergibt sich für die Halbwertszeit des DEPMPO-OOH-Adduktes τ ein Wert von 1280 ± 355 s. Dieser liegt im Bereich publizierter Werte der Halbwertszeit von DEPMPO-OOH-Addukt in anderen wäßrigen Systemen [49,122].

Im Unterschied zu dem Superoxid-Addukt des DMPO zerfällt das DEPMPO-OOH-Addukt viel langsamer und bildet dabei diamagnetische, mit ESR nicht nachweisbare Produkte.

Die Kinetik der DEPMPO-OOH-Adduktbildung wurde bei verschiedenen Superoxidbildungsraten im Xanthin/Xanthinoxidase System untersucht. Die Harnsäurebildung als Maß der Superoxidbildung wurde über die Absorption bei 290nm für jede Konzentration der Xanthinoxidase spektrophotometrisch kontrolliert (Kapitel 3.1).

Die ESR-Spektren wurden im Intervall von 2 min. aufgenommen. Bei der Auswertung diente die Amplitude des mittleren Duplets als Maß der Adduktbildung. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 31 dargestellt. Aus diesen Daten wird ersichtlich, daß bei höheren Superoxidbildungsraten (die obere Graphik auf Abb. 31) die Intensität der ESR-Amplitude solange monoton ansteigt, wie die Superoxidbildung andauert. Das Ende der Harnsäurebildung nach ca. 1100 sek ist durch den Verbrauch von Xanthin bedingt. Die etwas längere Zeit der DEPMPO-OOH-Adduktbildung kann auf die sich entwickelten anaeroben Bedingungen in der ESR-Meßzelle zurückzuführen sein. Es kann zu der beobachteten Verlangsamung der Superoxidbildung kommen, wenn die Konzentration des im Puffer gelösten Sauerstoffes im Laufe der Reaktion auf einen so niedrigen Wert absinkt, daß Sauerstoff nicht mehr im Überschuß vorhanden ist und die Reaktionsgeschwindigkeit limitiert ist. Die O₂-Diffusion kann den Verbrauch wegen der geringen Kontaktoberfläche mit der Luft nicht ausreichend kompensieren. Abgesehen von diesem Effekt ist die Bildung des DEPMPO-OOH-Adduktes - vor allem am Anfang der Reaktion - der Superoxidbildungsrate proportional.

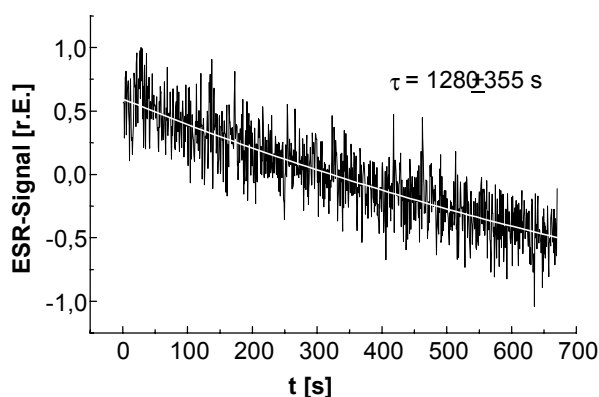
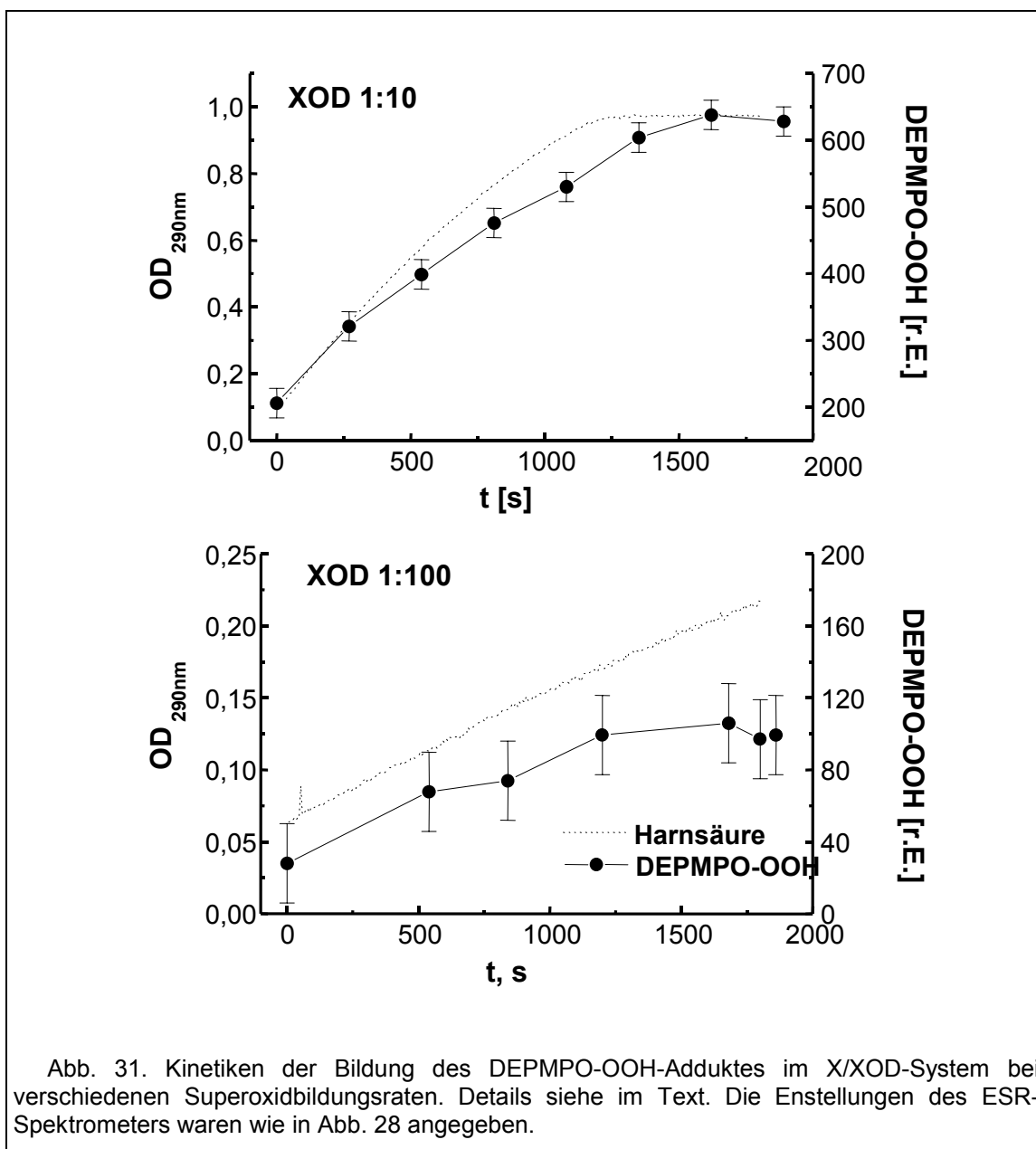


Abb. 30. Stabilität des DEPMPO-OOH-Adduktes im X/XOD-System (PBS, pH=7.4, 1mM DTPA, T=20°C). Details siehe im Text. Die Einstellungen des ESR-Spektrometers waren wie in Abb. 28 angegeben.

Versucht man mit dieser Methode niedrigere Superoxidbildungsraten nachzuweisen, bekommt man ein anderes kinetisches Bild (die untere Graphik auf Abb. 31). Die niedrigere Konzentration der Xanthinoxidase bedingt eine langsamere Superoxidbildungsrate, so daß Xanthin innerhalb der beobachteten Reaktionszeit nicht verbraucht wird. Die Zunahme der Amplitude des Signals vom DEPMPO-OOH-Addukt wurde auch in diesem Fall registriert. Die Bildungsrate des Superoxid-Adduktes war hier entsprechend niedriger.

Die Eigenschaften des Superoxidnachweises mit dem neuen Spintrap DEPMPO können somit wie folgt zusammengefaßt werden. Qualitativ erfolgt der Nachweis der $O_2^{\cdot -}$ -Bildung über ein entsprechendes Addukt mit charakteristischem ESR-Spektrum. Das Addukt weist eine höhere Stabilität als das DMPO-OOH-Addukt auf und zerfällt in diamagnetische Produkte. Das ESR-Spektrum des DEPMPO-Hydroxyl-Adduktes ist von dem des Superoxid-Adduktes verschieden. Dadurch wird eine genauere Identifizierung der Sauerstoff-Spezies ermöglicht.

So haben die Experimente mit DEPMPO deutlich demonstriert, daß in der als Modellsystem gewählten Reaktion des Xanthins mit Xanthinoxidase unter den erarbeiteten experimentellen Bedingungen keine Hydroxylradikale gebildet werden. Dies ist auch für die Analyse der mit den



anderen Nachweismethoden erhaltenen Ergebnissen erforderlich.

Beim quantitativen Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten ergab sich eine Proportionalität mit der Addukt-Bildungsrate. Die Möglichkeit genauer quantitativer Aussagen über die $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten über Spintrapping mit DEPMPO wird in Kapitel 4.4 analysiert.

3.7 Anwendbarkeit der $O_2^{\cdot-}$ -Detektionsmethoden zum Nachweis von $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in komplexen biologischen Systemen.

Das Auftreten freier Radikale in biologischen Systemen ist seit Jahrzehnten bekannt, besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den aktivierten Sauerstoffspezies. Mit dem Fortschritt der wissenschaftlichen Erkenntnis wurde ihre Beteiligung an den wichtigsten regulatorischen und metabolischen Prozessen lebender Organismen entdeckt. Die Beispiele für solche Prozesse sind Proliferation und Apoptosis von Zellen [125,134,135], Regulation des vaskulären Tonus und der Aggregation von Thrombozyten [98] sowie die Phagozytose [3,6,12].

Ebenso können aktivierte Sauerstoffspezies bei verschiedensten pathologischen Prozessen als Initiatoren sowie als Schrittmacher in Erscheinung treten. Hier sind die epidemiologisch am häufigsten auftretenden Prozesse wie Carzinogenese [16,45,140,141,151], Arteriosklerose [107,127] und Autoimmunerkrankungen [59,89] zu erwähnen.

Die initiale Bildung des Superoxidradikals durch eine univalente Reduktion des Sauerstoffs kann eine Reaktionskette im biologischen System in Gang setzen, die zur Bildung anderer Sauerstoffmetaboliten wie Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-, Alkoxy- und Peroxylradikale sowie Singulett-Sauerstoff führt [100]. Daher ist der Nachweis von Superoxidradikal als Initiator dieser Reaktionskette von besonderer Interesse.

Als potentielle biologische Quellen der Bildung von Superoxidradikalen *in vivo* gelten vor allem die elektronen-übertragenden Enzyme. Diese sind in den zellulären oder subzellulären Membranen eingebunden (NADPH-Oxidase von Immunzellen) sowie in freier Form vorhanden (Xanthinoxidase). Die nicht-enzymatische Komponenten von Zellen vermögen ebenfalls unter bestimmten Bedingungen Superoxidradikale zu bilden. Autooxidationsreaktionen von Hämoglobin und Myoglobin [29,59], von Ascorbinsäure und Catecholaminen in Anwesenheit von Fe-Spuren [34,90,92] sind Beispiele nicht-enzymatischer biologischer Quellen der Superoxidbildung.

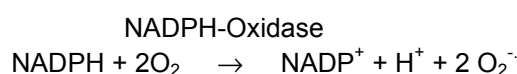
In dem vorliegenden Kapitel werden die zuvor im Modellsystem untersuchten Methoden für den Superoxidnachweis auf biologische Objekten unterschiedlicher Komplexität übertragen. Die Oxidation des Xanthins durch Xanthinoxidase, die auch als Modellsystem diente, ist gleichzeitig ein Beispiel von der einfachsten biologisch relevanten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle. Die Mitochondrien stellen als Zellorganellen ein biologisches System nächster Komplexitätsstufe dar, während die stimulierten Zellen, polymorphkernige Neutrophile, das komplexeste untersuchte $O_2^{\cdot-}$ -bildende System repräsentieren.

Die Ergebnisse der Anwendung der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweismethoden auf Superoxid- produzierende Mitochondrien und polymorphkernige Neutrophilen sind im weiteren beschrieben.

3.7.1 Polymorphkernige Neutrophile.

Bestimmte zelluläre Blutbestandteile (Polymorphkernige Neutrophile, Leukozyten) haben die Aufgabe, bei Entzündungsvorgängen Bakterien sowie Proteinfragmente durch Aufnahme in die Zelle und anschließender oxidativer Zerstörung zu eliminieren (Phagozytose). Radikalbildung durch Immunzellen spielt auch bei allen Autoimmunerkrankungen wie etwa rheumatischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle.

Die Produktion von Superoxid-Radikalen ist ein essentieller Teilschritt bei der von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) ausgeführten Phagozytose. Dies erfolgt über ein Enzym, die NADPH-Oxidase, welches Elektronen von endogenem NADPH einzeln auf Sauerstoff überträgt:



Reaktion 25

Die Reduktionsäquivalente werden in Form des NADPH über den Hexosemonophosphat-Weg zur Verfügung gestellt (Abb. 32).

In einer nicht aktivierten Zelle liegt die NADPH-Oxidase in Einzelkomponenten vor, die sich im Zytoplasma sowie in der Zellmembran befinden. Nach der Bindung von körperfremden Proteinen (Bakterien) an den Membranrezeptoren wird das Enzym NADPH-Oxidase "zusammgebaut" und die Superoxid-Radikalbildung wird gestartet. Dabei verbrauchen die PMN durch die O_2^- -Bildung mehr Sauerstoff, als für die normale Atmung notwendig ist. Dieses Phänomen wird in Literatur als "respiratory burst" bezeichnet.

Die Radikalbildung durch PMN kann *in vitro* durch phagozytische Partikeln (Latex, Zymosan), Kalziumabhängige Stimuli (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin) oder durch die Aktivatoren der Proteinkinase C (Phorbolmyristatacetat) stimuliert werden.

3.7.1.1 Zunahme des Sauerstoffverbrauchs als Maß der Superoxidbildung.

Die Superoxidbildung durch PMN wurde mit verschiedenen Nachweismethoden untersucht und verglichen. Opsoniertes Zymosan und Phorbolmyristatacetat wurden zur Stimulierung des „respiratory burst“ verwendet. Um die Nachweismethoden miteinander quantitativ vergleichen zu können, wurde ein zusätzlicher Bezugsparameter ausgewählt, der als Maß der Superoxidradikalbildung dienen sollte.

Die Voruntersuchungen ergaben, daß die gleiche Anzahl von Zellen, die aus verschiedenen Präparationen stammen, eine starke Streuung in ihrer radikalbildenden Aktivität aufweisen. Dies ergab sich aus dem Vergleich des Sauerstoffverbrauchs und der Reduktionrate des Cytochrom c. Die beobachtete Streuung ist auf Unterschiede in der Immunabwehr der Spendertiere zurückzuführen. Somit konnte die Zellzahl allein nicht als Maß der Radikalbildung dienen.

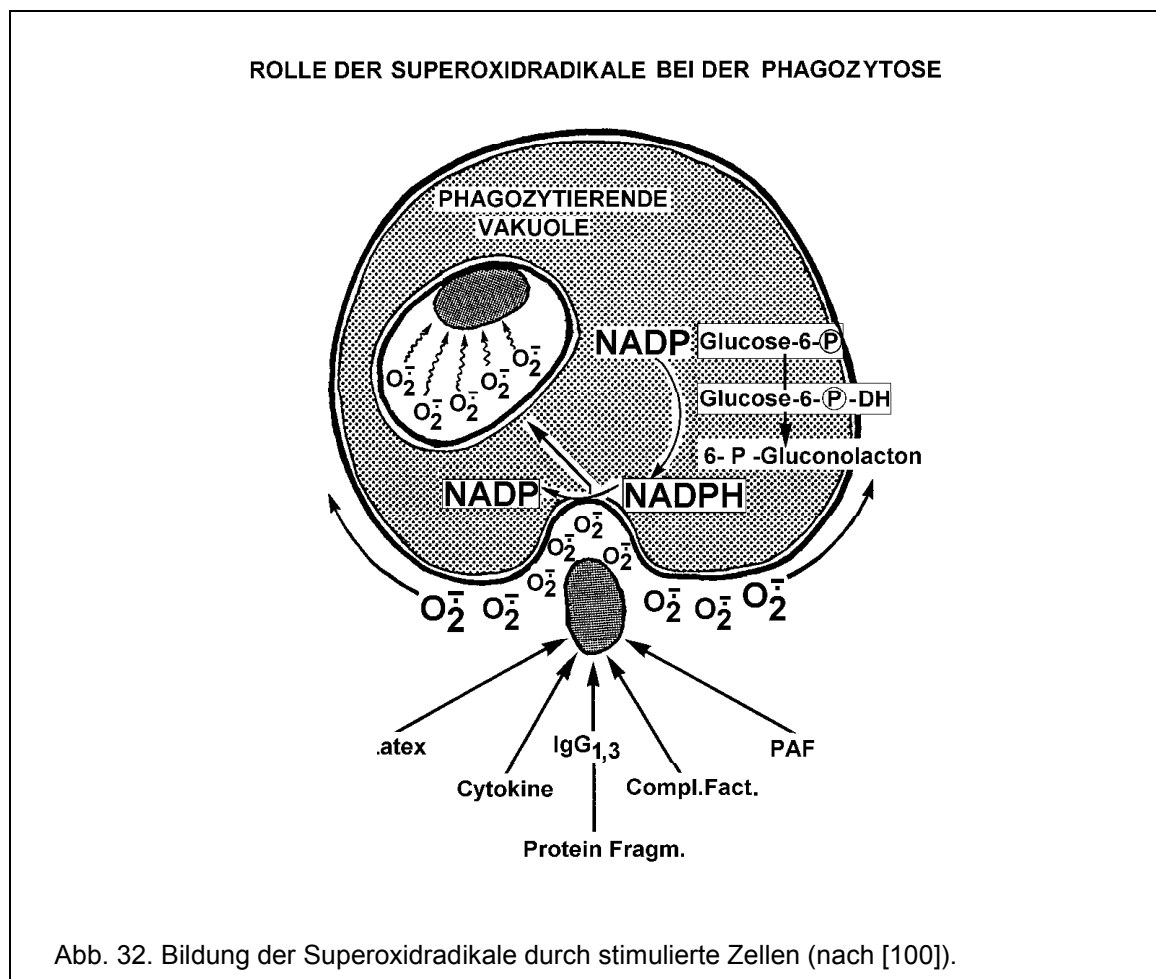
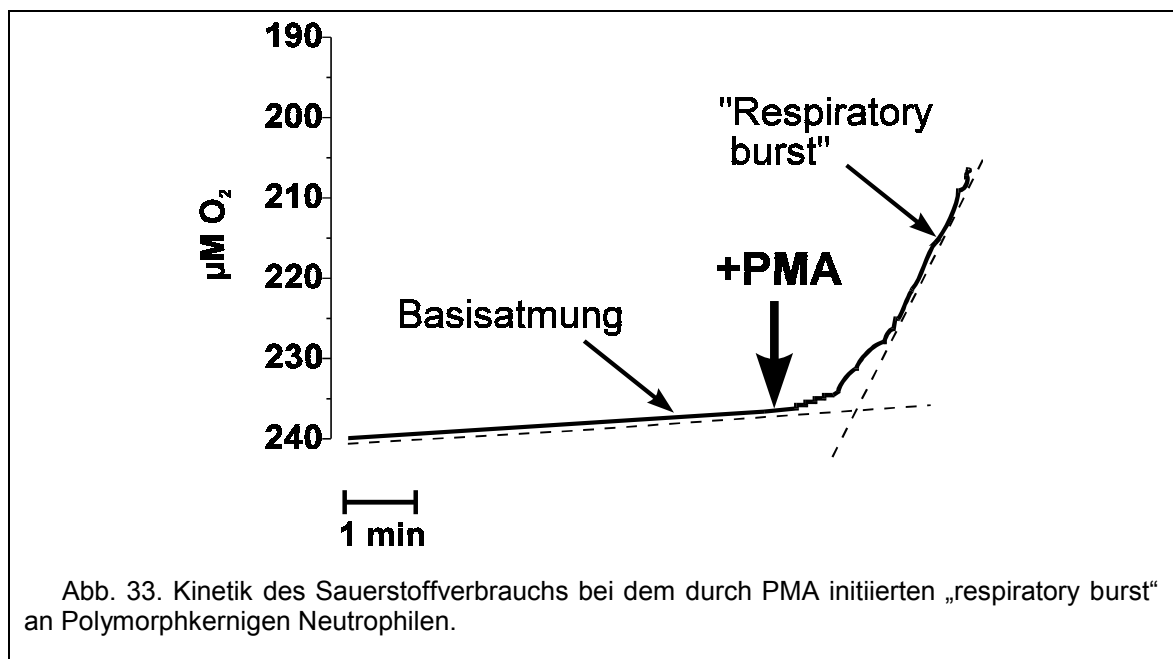


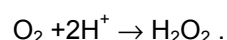
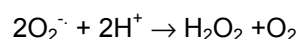
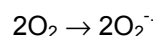
Abb. 32. Bildung der Superoxidradikale durch stimulierte Zellen (nach [100]).



Die Bildung von Superoxidradikalen an aktivierten Zellen erfolgt durch ein Enzym NADPH-Oxidase, wobei NADPH zum NADP oxidiert und Sauerstoff zum Superoxid reduziert wird (Reaktion 25). Diese Reaktion wird von einem Sauerstoffverbrauch begleitet, der mit Hilfe einer Clark-Elektrode registriert werden kann.

Ein typischer Verlauf des Aktivierungsprozesses ist in Abb. 33 dargestellt. Da die Zellen den Sauerstoff auch ohne Stimulierung durch die metabolischen Prozesse verbrauchen, wurde zuerst diese sogenannte Basisatmung gemessen. Kurz nach der Zugabe von Stimuli (PMA im Experiment in der Abb. 33) nimmt der Sauerstoffverbrauch drastisch zu. Opsoniertes Zymosan zur Stimulierung der Radikalbildung hatte einen qualitativ identischen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch. Da weder 2,4-Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien, der zu einem Anstieg des Sauerstoffsverbrauchs führen sollte, noch Cyanid, das die mitochondriale Atmung vollkommen hemmt, die Zunahme des zellulären Sauerstoffsverbrauchs beeinflussen konnten, wurde diese als von der mitochondrialen Atmung unabhängig angesehen. Hingegen konnte durch Diphenyliodoniumchlorid (DPI), ein Inhibitor der Superoxidradikale produzierenden NADPH-Oxidase, der Sauerstoffverbrauch vollkommen gehemmt werden. Daher wurde der erhöhte Sauerstoffverbrauch bei der Aktivierung von PMN als Folge der Bildung von Superoxidradikalen interpretiert. Die Basisatmung wurde von dem Sauerstoffverbrauch während des „respiratory burst“ subtrahiert und die so errechnete Differenz als Maß der Superoxidbildung betrachtet.

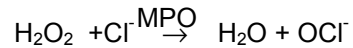
Die tatsächliche $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate kann jedoch aus dem Sauerstoffverbrauch nur annähernd abgeleitet werden. Die Ursache hierfür ist die Möglichkeit der spontanen $O_2^{\cdot-}$ -Dismutation. Bei der ausschließlichen Eliminierung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale durch Dismutation entspricht 1 Mol des verbrauchten Sauerstoffs der Bildung von 2 Mol Superoxid:



Reaktion 26

Diese 2:1 $O_2^{\cdot-}/O_2$ -Stöchiometrie gilt nur unter der Bedingung, daß bei den weiteren Reaktionen des Superoxides kein Sauerstoff mehr freigesetzt wird. Die Bedingung ist z. B. erfüllt, wenn das $O_2^{\cdot-}$ -

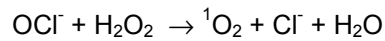
Dismutationsprodukt H_2O_2 ausschließlich durch Myeloperoxidase (MPO) umgesetzt wird:



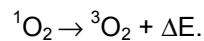
Reaktion 27

und Hypochlorit (OCl^-) nur mit Lipid- und Proteinmolekülen reagiert, wobei kein Sauerstoff freigesetzt wird.

Wenn aber H_2O_2 mit Hypochlorit weiter reagiert, dann kommt es zu einer zusätzlichen Freisetzung des Sauerstoffs, der bei der Rückkehr des Singuletsauerstoffs in den Triplettzustand gebildet wird:



Reaktion 28



Reaktion 29

In dieser Sequenz der Reaktionen entspricht 1 Mol des verbrauchten Sauerstoffs den 4 Mol des gebildeten Superoxides.

Wie oben gezeigt wurde, liegt die tatsächliche $\text{O}_2^{\cdot -} / \text{O}_2$ -Stöchiometrie (Sauerstoffverbrauch/Superoxidbildung) im Bereich zwischen 2 und 4. In folgenden Untersuchungen wurde angenommen, daß sie - von ihrem genauen Wert abgesehen - konstant bleibt, so daß die Zunahme im Sauerstoffverbrauch als Maß der Superoxidbildung dienen kann.

3.7.1.2 Anwendung der photometrischen Methoden.

Bei der Anwendung der Farbstoffe zum Nachweis der Radikalbildung an Zellen muß berücksichtigt werden, daß die suspendierten Zellen durch Lichtstreuung die optische Dichte beeinflussen. Das Erfassen des Indikatorfarbstoffes erfordert daher die Anwendung einer Messung bei zwei Wellenlängen.

Die zur Stimulierung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung an PMN verwendeten Induktoren (Zymosan und PMA) wurden zunächst auf eine mögliche direkte Interaktion mit den Nachweissystemen untersucht, um falsch positive (negative) Ergebnisse auszuschließen. Hierzu wurden diese mit Cytochrom c, Epinephrin und NBT einzeln inkubiert und die optische Dichte bei den entsprechenden Wellenlängen verfolgt. Weder PMA noch Zymosan waren in der Lage, die für die Reaktionsprodukte charakteristischen Veränderungen der optischen Dichte im Meßpuffer direkt hervorzurufen, solange keine PMN zugesetzt wurden.

Die Aktivierung der Superoxidbildung an PMN mit PMA oder mit Zymosan erfolgte wie in Kapitel 2.5.1.3 beschrieben. Die Konzentration der Zellen von ca. 10^6 ml^{-1} wurde so gewählt, daß die Zunahme im Sauerstoffverbrauch unter der Stimulierung sich im Bereich von 2.5-25 $\mu\text{M}/\text{min}$ bewegte. Die gewünschte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde durch die Konzentration von Zellen eingestellt. Zur Abschätzung der produzierten Superoxidbildungsrate dienten die Messungen des Sauerstoffverbrauchs durch die eingesetzte Konzentration der Zellen, die in parallel gestellten Experimenten erfolgten, wie in Kapitel 3.7.1.1 diskutiert.

3.7.1.2.1 Probleme bei der Anwendung des Nitroblau Tetrazoliums zum Superoxidnachweis an stimulierten PMN.

Um die Bildung von Superoxidradikalen an PMN zu initiieren, wurden diese in dem entsprechenden Meßpuffer (s. Kapitel 2.5.1.3) in der Konzentration von ca. 10^6 ml^{-1} suspendiert und mit den Stimuli wie PMA oder Zymosan versetzt. Die resultierende $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung wurde durch den Sauerstoffverbrauch kontrolliert, der mit einer Clark-Sauerstoffelektrode gemessen wurde.

Die Inkubation von PMN mit 100 μM Nitroblau Tetrazolium ohne Zugabe von Stimuli hatte keine wesentliche Formazanbildung zu Folge. Wurden die Zellen unter Zugabe von NBT mit PMA oder Zymosan stimuliert, so kam es zur Bildung des dunkelblauen Reaktionsproduktes (Formazan), das bei der Reduktion von NBT erhalten wird. Qualitativ hatte SOD eine hemmende Wirkung auf die Formazanbildung, eine Quantifizierung des Reaktionsproduktes über die Veränderung der optischen Dichte bei 540nm war jedoch sehr schwierig.

Das Problem lag darin, daß das Reduktionsprodukt des NBT, Formazan, eine wasserunlösliche Substanz ist und die Zellen beeinflusst. Das hat zur Folge, daß die Zellen in Anwesenheit von NBT agglutinieren und sedimentieren. Zu berücksichtigen ist dabei auch, daß die Fähigkeit der Zellen, Superoxidradikale zu produzieren durch die Veränderung der Membranstruktur mit unlöslichen Formazanen gestört werden kann. Da Formazane eine toxische Wirkung auf die PMN haben, erwies sich die NBT-Methode zum Superoxidnachweis an stimulierten Zellen als ungeeignet.

3.7.1.2.2 Die Reduktion von Cytochrom c durch Superoxidradikale von stimulierten PMN.

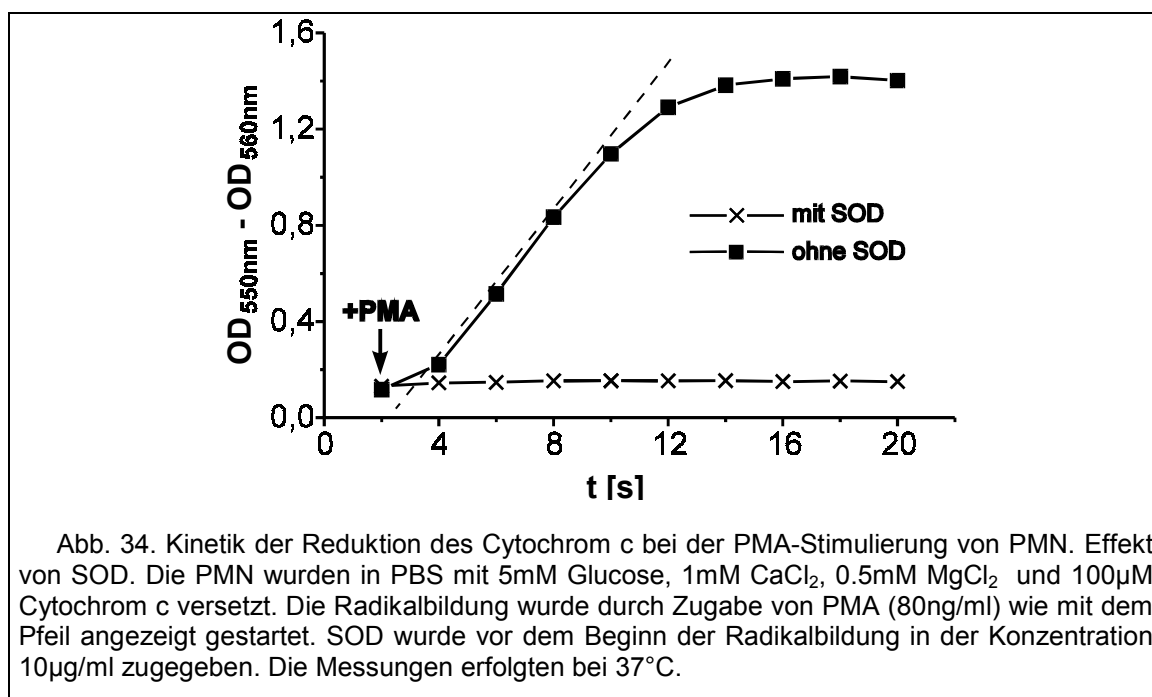
Die zweite photometrische Methode, die zum Nachweis der Superoxidradikale an PMN eingesetzt wurde, beruht auf der Reduktion von Cytochrom c. Die Radikalbildung an PMN wurde durch den Zusatz von Stimuli (Zymosan oder PMA) gestartet, wobei die Zunahme an Sauerstoffverbrauch, welche in Kontrollexperimenten unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Cytochrom c, gemessen wurde, als Maß der Superoxidbildung diente (s. Kapitel 3.7.1.1).

In Experimenten mit den durch Zymosan oder durch PMA stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen wurde eine mit SOD vollkommen hemmbare Reduktion des Cytochrom c beobachtet. Eine typische Kinetik dieser Reduktion unter der PMA-Stimulierung ist in Abb. 34 dargestellt. Die Zunahme der optischen Dichte bei 550nm zeigte die Bildung des reduzierten Cytochrom c an. Bei der Aktivierung von Zellen mit Zymosan wurde eine qualitativ gleiche Kinetik registriert. Vor der Zugabe von PMA oder Zymosan wurde keine Reduktion des Cytochrom durch PMN beobachtet.

Unter Berücksichtigung des Reaktionsmechanismus weist die Hemmbarkeit mit SOD auf eine ausschließliche Beteiligung der Superoxidradikale an der Reduktion des Cytochroms durch stimulierte PMN hin.

Nachdem die Cytochrom c-Methode beim Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an PMN eine gute Selektivität für Superoxidradikale aufgezeigt hat, wurde der quantitative Aspekt des $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises analysiert. Hierfür wurde die mit der Cytochrom c-Methode nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate ($O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate) in Abhängigkeit von der durch PMN produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate untersucht.

Die $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate wurde aus der Kinetik der Bildung von reduziertem Cytochrom c wie folgt errechnet. Eine Tangente wurde an dem Wendepunkt der kinetischen Kurve der Cytochrom c-Bildung angelegt (punktierte Linie in Abb. 34). Die $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate wurde aus dem Steigungswinkel unter der Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten und des stöchiometrischen Koeffizienten $n=1$ nach der Gleichung 10 berechnet.



Die Bildungsrate des reduzierten Cytochrom c wurden gegen den unter den gleichen Bedingungen gemessenen Sauerstoffverbrauch bei der PMA- sowie Zymosan-Stimulierung aufgetragen und linear approximiert (Abb. 35 und Abb. 36).

Im Falle des Zymosans wurde aus dem Steigungskoeffizienten der linearen Approximierung ersichtlich, daß nur 8% von dem insgesamt verbrauchten Sauerstoff in Form von Superoxidradikalen mit der Cytochrom c-Methode wiedergefunden werden konnten (Abb. 35), da der Wiederfindungskoeffizient hier 0.08 beträgt.

Werden die Zellen anstelle des Zymosans mit PMA aktiviert, steigt die mit der Cytochrom c-Methode nachgewiesene Superoxidbildungsrate. Der Sauerstoffverbrauch - und die hierdurch abgeschätzte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate - bleibt auf dem gleichen Niveau, wie bei der Zymosan-Stimulierung, während die Reduktionsrate des Cytochrom c - und somit die $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate - zunimmt. Der Steigungskoeffizient der linearen Approximierung im Falle der PMA-Stimulierung ergibt den Wiederfindungskoeffizient von 1.27 (Abb. 36).

Bei der Stimulierung mit PMA wird die Abhängigkeit der $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate mit guter Genauigkeit (Abb. 36, $r=0.99$) durch eine lineare Approximierung beschrieben. Die Stimulierung mit Zymosan ergibt jedoch eine Abhängigkeit, die bei hohem Sauerstoffverbrauch von der Linearität abweicht (Abb. 35, $r=0.81$) und eine niedrigere Wiederfindungsrate ergibt.

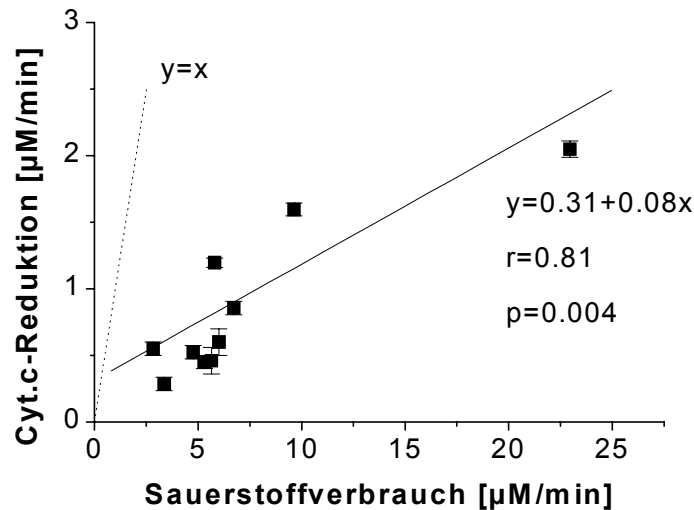


Abb. 35. Reduktionsrate des Cytochrom c in Abhängigkeit vom O₂-Verbrauch durch Zymosan-stimulierte PMN. Die Zellen wurden in PBS mit 5mM Glucose, 1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂ und 100µM Cytochrom c versetzt. Die Konzentration von Cytochrom c betrug 50mM. Die Radikalbildung wurde durch Zugabe von 25µg/ml opsoniertem Zymosan gestartet. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit einer Clark-Sauerstoffelektrode gemessen. Alle Messungen erfolgten bei 37°C.

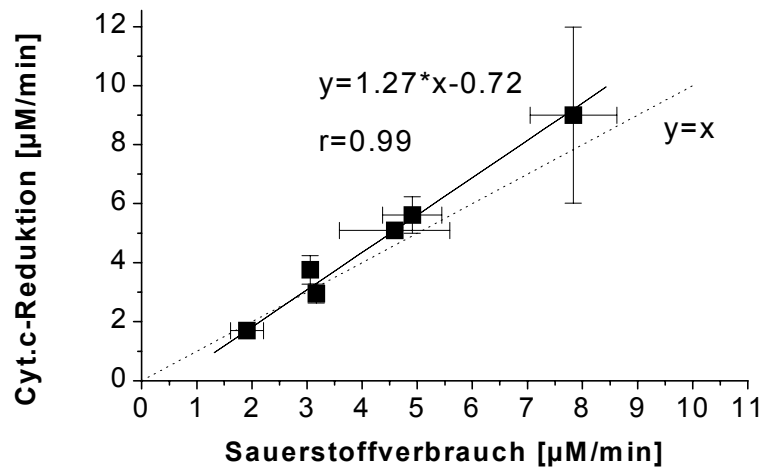


Abb. 36. Abhängigkeit der Cytochrom c-Reduktionsrate vom Sauerstoffverbrauch durch die PMA-stimulierten Polymorphkernigen Neutrophile. Die Reaktionsbedingungen sind wie in Abb. 34 angegeben.

Ob die verminderte Wiederfindungsrate der Superoxidradikalbildung im Falle des Zymosans auf seine (bzw. dessen eventuellen Verunreinigungen) Radikalfänger-Eigenschaften zurückzuführen ist, wurde experimentell überprüft. Hierfür wurde die Reduktionsrate des Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System in An- und Abwesenheit des Zymosans gemessen. Wenn Zymosan bzw. seine Verunreinigungen die Superoxidradikale effektiv abfangen könnten, dann wäre die Reduktionsrate des Cytochrom c durch Zugabe von Zymosan gehemmt.

Experimentell wurde jedoch festgestellt, daß Zymosan in der gleichen Konzentration wie für die Stimulierung von PMN keinen Einfluß auf die Reduktionsrate des Cytochroms hat und somit kein wirksamer O₂⁻-Radikalfänger ist.

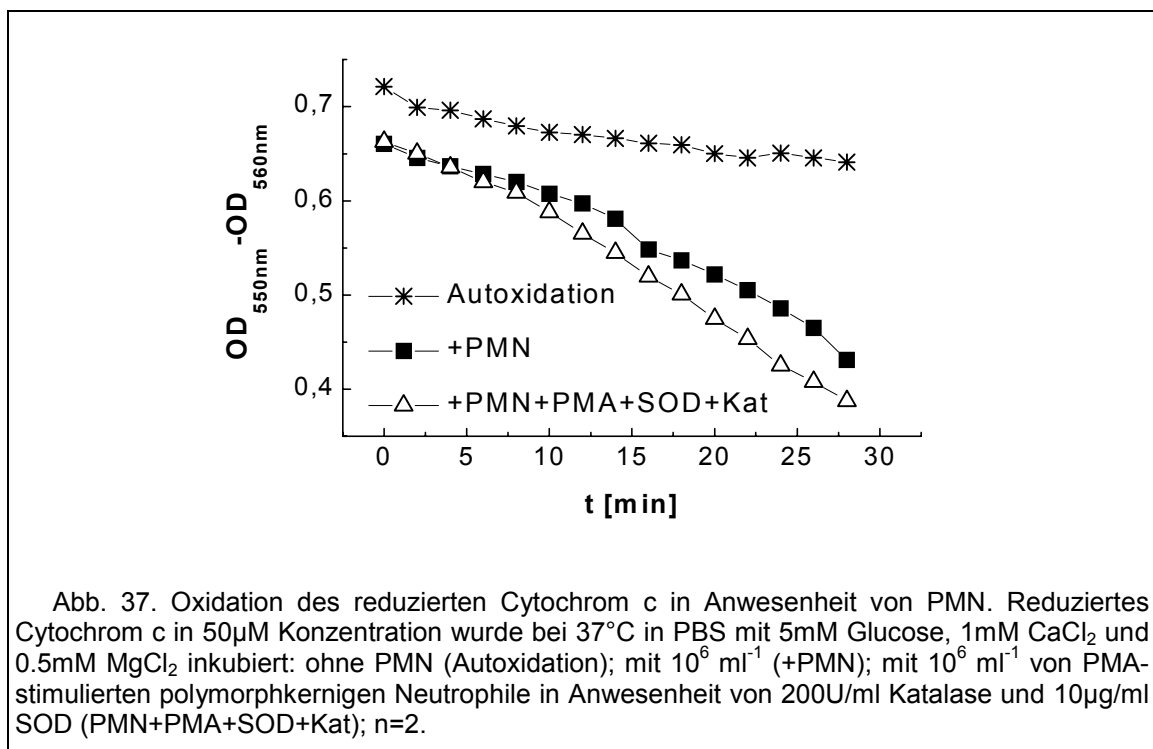
Eine andere Erklärung für diese je nach Aktivierungsart unterschiedlichen Wiederfindungsraten könnte sich aus der Tatsache ergeben, daß die verschiedenen Initiatoren über unterschiedliche Wege die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung in Gang setzen.

Im Unterschied zur PMA-Aktivierung, wird die Aktivierung durch Zymosan über Phagozytose eingeleitet. Das bedeutet, daß die Superoxidradikale hauptsächlich in einem das Zymosan-Partikelchen umhüllenden Phagosom gebildet werden, was zu einer erhöhten lokalen $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration im Phagosom führt. Dies hat zur Folge, daß die Geschwindigkeit der Spontandismutation zum Wasserstoffperoxid (H_2O_2) steigt und die vorhandene Konzentration von Cytochrom c nicht mehr ausreichend ist, um mit der Dismutation effizient zu konkurrieren. Außerdem wird das Enzym Myeloperoxidase (MPO) in millimolaren Konzentrationen in das Phagosom ausgeschüttet, so daß die Reaktion zwischen $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen und MPO [43,65] ebenfalls mit der Spontandismutation konkurriert und somit den Anteil der mit Cytochrom c reagierenden $O_2^{\cdot-}$ -Radikale verringert.

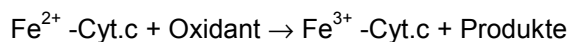
Für die Hypothese, daß die lokal unterschiedliche Konzentration der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale die Wiederfindungsrate beeinflussen kann, sprechen auch die in der Literatur beschriebenen Experimente. So wurde u.a. gezeigt [54], daß die Behandlung der PMN mit Cytochalasin B, welches die Bildung von Phagosomen verhindert, zur Erhöhung der nachgewiesenen $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate führt. Die Tatsache, daß die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate unter der Stimulierung mit Latex-Partikeln vom Verhältnis Stimuli/Zellzahl abhängig ist [149], unterstützt die Hypothese ebenfalls.

Die Cytochrom c-Methode kann erhöhte Werte der Wiederfindungsraten liefern, wenn Cytochrom durch andere Komponenten des Systems als Superoxidradikale reduziert wird. Ob das der Fall ist, läßt sich durch die Untersuchung der SOD-Hemmbarkeit der Cytochrom c - Reduktion überprüfen. Um auszuschließen, daß die Bildung des Indikatorsystems (des reduzierten Cytochrom c) auch unabhängig von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen über Komponenten des biologischen Systems selbst zustande kommt, wurde der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis stets in An- und Abwesenheit von SOD durchgeführt. In den Zymosan- oder PMA-stimulierten Zellen wurde eine 100% ige Hemmung der Cytochrom c - Reduktion in Anwesenheit von SOD (die Endkonzentration $10\mu g/ml$) beobachtet. Somit kann eine zusätzliche unspezifische Reduktion des Cytochrom c durch die PMA- oder Zymosan- stimulierten Zellen ausgeschlossen werden.

Eine Rückreaktion, nämlich eine Oxidation des gebildeten reduzierten Cytochrom c durch die Komponenten des Meßsystems (Reaktion 30), kann hingegen die mit der Cytochrom c-Methode



nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate erniedrigen:



Reaktion 30

Um festzustellen, ob die Reaktion 30 den quantitativen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an stimulierten PMN beeinflusst, wurde die Oxidationsrate des zuvor reduzierten Cytochrom c in An- und Abwesenheit von Zellen gemessen.

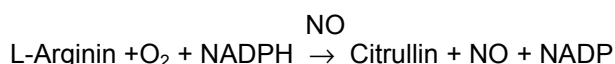
Hierbei wurde festgestellt, daß die Oxidation des reduzierten Cytochrom c in Anwesenheit von Zellen schneller abläuft, als dessen Autoxidation unter den gleichen Bedingungen. Ein repräsentatives Experiment ist in Abb. 37 dargestellt. Die maximale Rate der Oxidation des reduzierten Cytochrom c in Anwesenheit von Zellen betrug - je nach Präparation - 0.5-1.5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Vergleicht man diesen Wert mit der Reduktionsrate des Cytochroms durch die mit Zymosan stimulierten Zellen (Abb. 35), dann wird ersichtlich, daß die Oxidation des reduzierten Cytochroms einen wesentlichen Beitrag zur scheinbaren Verminderung der Reduktionsrate in diesem System leisten kann.

Die beobachtete Oxidation des reduzierten Cytochrom c in Anwesenheit von PMN kann sich sowohl nach einem enzymatischen wie auch einem nicht-enzymatischen Mechanismus entwickeln.

Obwohl alle Versuche an Zellpräparationen durchgeführt wurden, in welchen der Anteil intakter Zellen über 95% lag, ist ein geringer Anteil der Zellen immer geschädigt. Da die Membranintegrität dieser Zellen gestört ist, werden intrazelluläre Enzyme, u.a. die redox-zyklisierende Cytochrom c-Oxidase, auch für das extrazelluläre Cytochrom c zugänglich. Diese könnten die Oxidation des reduzierten Cytochrom c verursachen. Diese Nebenreaktionen sind bekannt. Um sie zu unterdrücken, setzt man acetyliertes Cytochrom c, dessen enzymatischer Umsatz erschwert ist, für die Untersuchung der Superoxidradikalbildung an subzellulären Fraktionen ein [62].

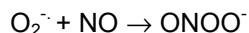
Auch andere Oxidantien, die neben dem Superoxid in diesem biologischen System gebildet werden, sind in der Lage, reduziertes Cytochrom c zu oxidieren. Die Oxidation des reduzierten Cytochrom c konnte z.B. durch einen starken Oxidanten Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) erfolgen, der aus dem unter der Stimulierung freigesetzten Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid gebildet wird.

Bei der Stimulierung von PMN wird u.a. ein Enzym, die induzierte NO-Synthase (NOS) aktiviert. Das Enzym katalysiert die NADPH- und O_2 -abhängige Oxidation des L-Arginins zu Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO):



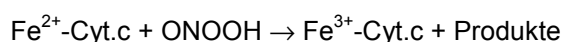
Reaktion 31

Stickstoffmonoxid reagiert mit Superoxid ($k=(4.3\div 6.7)\cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), wobei ein starker Prooxidant, das Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$), gebildet wird:



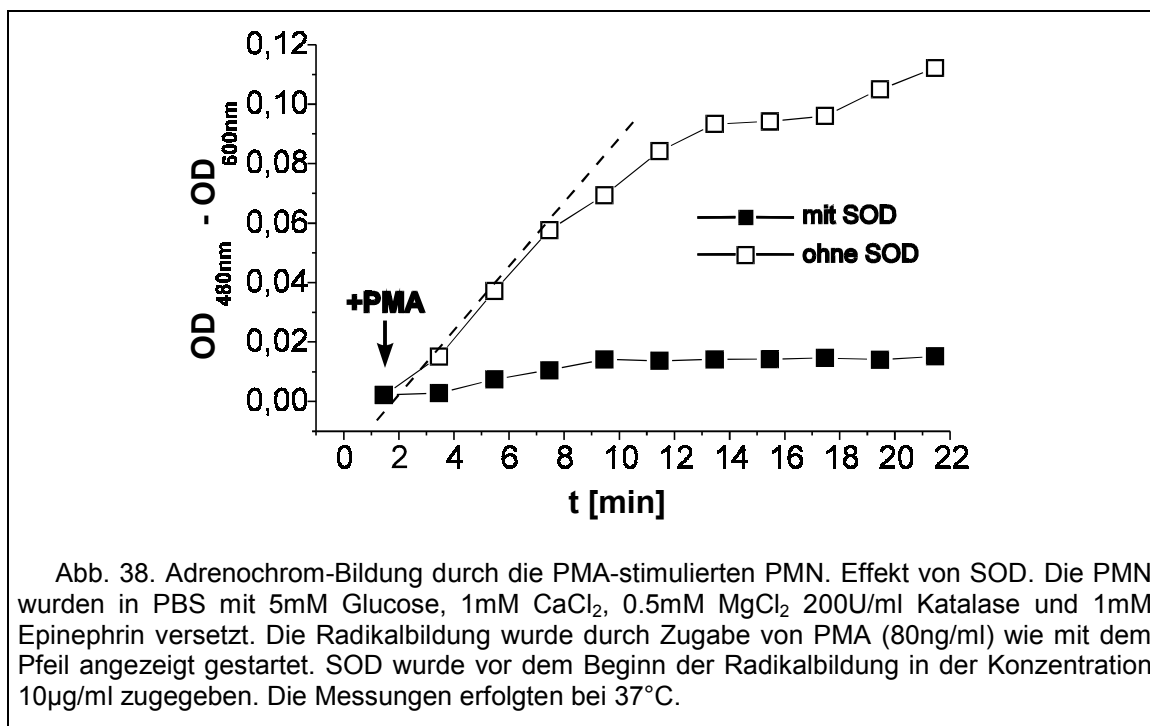
Reaktion 32

Da nur die protonierte Form des Peroxynitrites mit reduziertem Cytochrom c reagiert und $ONOOH$ einen pK-Wert von 6.8 aufweist [137], ist eine Oxidation des reduzierten Cytochrom c durch Peroxynitrit bei physiologischen pH-Werten nicht zu erwarten. Außerdem zerfällt die protonierte Form des Peroxynitrites $ONOOH$ bei $\text{pH}=7.4$ mit der charakteristischen Zeit $\tau \sim 1 \text{sek}$ [64]. Im geschlossenen Phagosom sinkt jedoch der pH-Wert bis auf 5.0, so daß eine Oxidation des reduzierten Cytochroms durch Peroxynitrit begünstigt wird. Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion (Reaktion 33)



Reaktion 33

wird mit $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($\text{pH}=6.5$) bzw. $2\cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($\text{pH}=5.0$) angegeben [137].



Die Dismutationsreaktion wird ebenfalls durch die pH-Senkung in dem Phagosom beschleunigt. Das wäre eine mögliche Erklärung der viel zu niedrigen Reduktionsrate des Cytochroms im Falle des phagozytierbaren Zymosans im Vergleich zu PMA, wenn keine Phagosomen gebildet werden.

Da jedoch die Oxidationsrate von reduziertem Cytochrom c in Anwesenheit von SOD, welche durch Dismutation der Superoxidradikale die Bildung von Peroxynitrit ebenfalls hemmt, nicht beeinflusst wurde (Abb. 37), wurde der Beitrag von Peroxynitrit zur Oxidation von reduziertem Cytochrom c unter diesen experimentellen Bedingungen (Stimulierung mit PMA) als unwesentlich angesehen.

Die Anwendung der Cytochrom c -Methode zum Nachweis der O₂⁻-Bildung an PMN erbrachte somit folgende Ergebnisse. Die stimulierten PMN reduzieren Cytochrom c ausschließlich nach einem O₂⁻-abhängigen Mechanismus. Die erheblichen quantitativen Unterschiede im Nachweis der Superoxidbildungsrate bei Anwendung verschiedener Stimuli (PMA und Zymosan) wurden auf die nicht-homogene räumliche Verteilung produzierter O₂⁻-Radikale sowie auf mögliche Nebenreaktionen zurückgeführt. Im Falle der Stimulierung mit Zymosan werden Phagosomen mit hoher lokaler O₂⁻-Konzentration gebildet, was die Superoxiddismutation oder die Reaktion mit anderen, ins Phagosom ausgeschütteten Komponenten beschleunigt und die nachgewiesene O₂⁻-Bildungsrate hierdurch vermindert. Die nachgewiesene O₂⁻-Bildungsrate an stimulierten PMN kann auch durch eine enzymatische Oxidation des reduzierten Cytochrom c verringert werden, die durch aus beschädigten Zellen freigesetzte Cytochromoxidasen zustande kommt.

Dadurch kann die Cytochrom c -Methode erniedrigte Werte beim Nachweis der O₂⁻-Bildungsrate an stimulierten PMN erbringen.

3.7.1.2.3 Anwendung des Epinephrins zum Nachweis der Superoxidradikalbildung an stimulierten PMN.

In folgendem Kapitel werden qualitative und quantitative Aspekte des O₂⁻-Nachweises mit der Epinephrin-Methode an stimulierten PMN untersucht. Der Phorbol-ester PMA und opsoniertes Zymosan wurden zur Stimulierung eingesetzt, wobei die Zunahme an Sauerstoffverbrauch wiederum als Maß der Superoxidbildung diente (s. Kapitel 3.7.1.1).

Die Konzentration der Zellen wurde so gewählt (ca. 10⁶ ml⁻¹), daß die eingeschätzte Superoxidbildungsrate in dem Bereich liegt, der für das Modellsystem mit dieser Methode untersucht wurde (2.5-25µM/min). Die nachzuweisende O₂⁻-Bildungsrate wurde durch die Konzentration von Zellen eingestellt. Die Konzentration des Epinephrins von 1mM für den O₂⁻-Nachweis an PMN wurde aus dem Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) übernommen.

Da die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung in Zellsuspensionen bei 37°C und im Meßpuffer ohne Zusatz des Metallchelators DTPA erfolgte, kann man mit einer Autoxidation von Epinephrin rechnen, welche ebenfalls in einer Adrenochrombildung resultiert. Der Beitrag der Autoxidation des Epinephrins zur Adrenochrombildung wurde unter experimentellen Bedingungen untersucht.

Wenn die Konzentration des Epinephrins, wie in den nachfolgenden Experimenten, 1mM betrug, dann wurde eine Adrenochrombildungsrate von 0.23 μ M/min bei 37°C in dem Meßpuffer (mit Glucose, Ca^{2+} , Mg^{2+} und Katalase, s. Kapitel 2.5.1.3) ohne Zellen registriert.

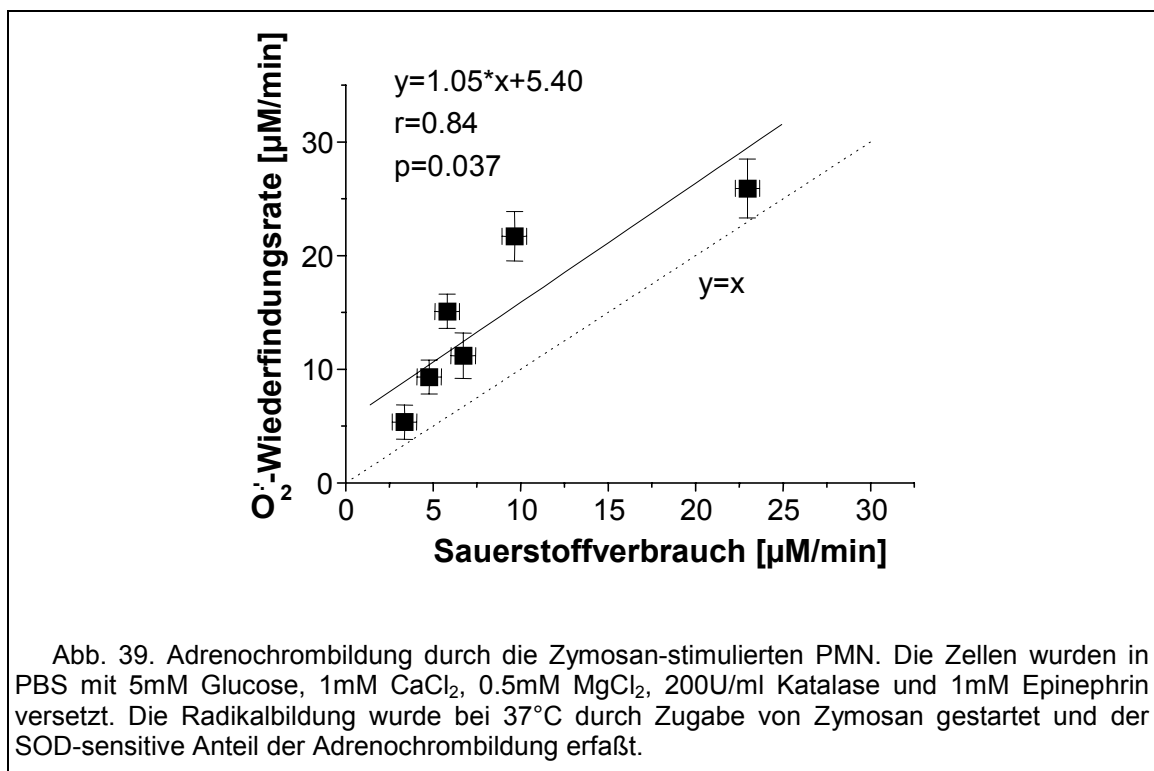
Bei der Stimulierung von PMN in Anwesenheit von Epinephrin konnte eine für die Adrenochrombildung charakteristische Zunahme der optischen Dichte bei 480nm registriert werden. Eine typische Kinetik der Adrenochrombildung ist in Abb. 38 gezeigt. In diesem Experiment wurden die Zellen durch PMA aktiviert. Die Form des kinetischen Ablaufs ändert sich nicht, wenn statt PMA opsoniertes Zymosan zur Aktivierung eingesetzt wird.

Der größte Teil der Adrenochrombildung war mit SOD hemmbar, ein geringer Anteil jedoch nicht (Abb. 38). Dies zeigt, daß auch andere Komponenten als Superoxidradikale bei der Stimulierung von Zellen gebildet werden, die ebenfalls Epinephrin zum Adrenochrom oxidieren können.

Um nur den Beitrag von $O_2^{\cdot-}$ -abhängigen Reaktionen zur Adrenochrombildung selektiv anzurechnen, wurden die nachfolgenden Messungen stets gegen eine Referenzküvette mit Inhalt gleicher Zusammensetzung plus SOD durchgeführt. Der Anteil der Autoxidation an der Adrenochrombildung läßt sich auf diese Weise ebenfalls bestimmen, da diese Reaktion bei neutralem pH-Wert mit SOD nicht hemmbar ist.

Zur Beurteilung des quantitativen Aspektes der Epinephrin-Methode in Anwendung auf den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis bei der Stimulierung von PMN wurde die Abhängigkeit der nachgewiesenen von der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate aufgenommen.

Die produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate, welche die aktivierten PMN erbringen, wurde aus dem Sauerstoffverbrauch in parallel laufenden Experimenten - wie in Kapitel 3.7.1.1 beschrieben - abgeleitet. Die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde mit dem Koeffizienten $n=4$ aus der Adrenochrombildungsrate nach der Gleichung 10 kalkuliert. Die Adrenochrombildungsrate wurde aus dem Steigungswinkel der am Wendepunkt angelegten Tangente (die punktierte Linie in Abb. 38) errechnet.



Die Ergebnisse der Anwendung der Epinephrin-Methode für die Bestimmung der Superoxidbildungsrate an den mit Zymosan stimulierten PMN sind in Abb. 39 dargestellt. Der aus der linearen Approximierung bestimmte Wiederfindungskoeffizient lag bei 1.05, wenn die 4:1 Superoxid:Adrenochrom Stöchiometrie für die Berechnung zugrunde gelegt wurde. Die lineare Abhängigkeit ist nur annähernd an die Beschreibung experimenteller Daten angepaßt ($r=0.84$). Aus Abb. 39 wird ersichtlich, daß die $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsrate zu einer Sättigung bei höherem Sauerstoffverbrauch tendiert.

Wurden die Zellen mit PMA stimuliert, dann lag der für die Epinephrin-Methode bestimmte Wiederfindungskoeffizient bei 1.48 ± 0.49 (Abb. 40), wenn dieser unter den gleichen Annahmen, wie für die Zymosan-Stimulierung beschrieben, berechnet wurde. Somit sind die Wiederfindungskoeffiziente, die mit der Epinephrin-Methode erhalten wurden, für PMA- und Zymosan-stimulierte Zellen verschieden. Wie im Kapitel 0 diskutiert, reflektiert der niedrigere Wiederfindungskoeffizient im Falle der Stimulierung mit Zymosan die Bildung von Phagosomen, die bei der Stimulierung mit PMA nicht gebildet werden. Die hohe lokale Konzentration der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale, die im Phagosom entsteht, begünstigt die Dismutation und die Nebenreaktionen (z.B. mit Myeloperoxidase), wodurch der Anteil von mit Epinephrin reagierenden Superoxidradikalen vermindert wird.

Da Epinephrin einen ca. 10mal geringeren Extinktionskoeffizienten als Cytochrom c hat, ist die Zunahme der optischen Dichte bei gleichen physiologisch relevanten Radikalbildungsraten um eine Größenordnung geringer. Darauf ist die große Streuung ($r=0.67$) der $O_2^{\cdot-}$ -Wiederfindungsraten bei Anwendung der Epinephrin-Methode zum Nachweis der niedrigen, physiologisch relevanten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten zurückzuführen.

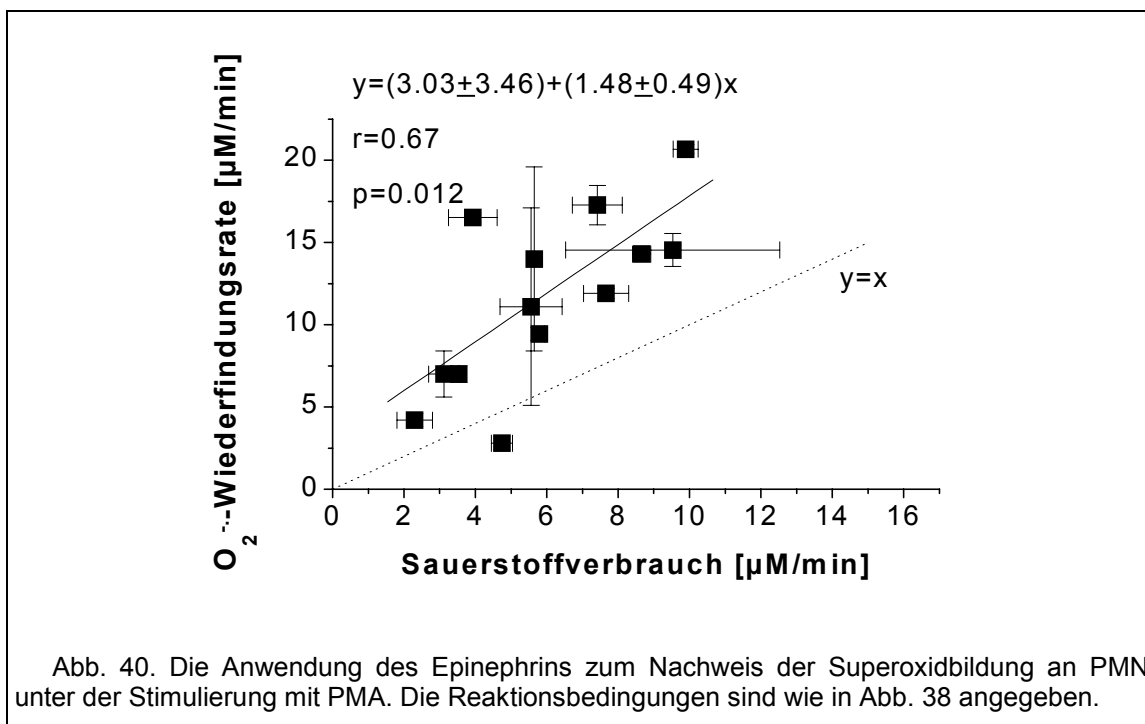
Eine zusätzliche Erklärung der großen Streuung wäre, daß die SOD-sensitive Komponente der Adrenochrombildung an stimulierten PMN auch durch andere Faktoren, als nur die Superoxidradikale, beeinflusst wird.

Ein starker Oxidant wie Peroxinitrit, der bei der Stimulierung von Zellen gebildet werden kann (s. Kapitel 0, Reaktion 32), könnte z. B. zur Oxidation von Epinephrin beitragen und somit die Bildung von Adrenochrom fördern. SOD hemmt die Entstehung von Peroxinitrit über die Desaktivierung von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen, so daß die Peroxinitrit-vermittelte Oxidation des Epinephrins zu der SOD-sensitiven Komponente der Adrenochrombildung gehören würde. Die Adrenochrombildungsrate würde in diesem Fall nicht nur durch die Bildungsrate von Superoxidradikalen bestimmt, sondern wäre auch durch Produktion des Stickstoffmonoxides (NO) und somit des Peroxinitrites bedingt.

Ob bestimmte Nebenreaktionen, die bei stimulierten PMN zu erwarten sind, die registrierte Adrenochrombildung beeinflussen können, wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Wenn das gebildete Adrenochrom mit den Oxidanten, die neben den $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen durch stimulierte Zellen produziert werden, weiter reagiert, so daß die optische Dichte bei 480nm sich verändert, dann könnte dies die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate verfälschen.

Experimentell wurde jedoch festgestellt, daß das gebildete Adrenochrom innerhalb der Meßzeit (20min) in dem System stabil bleibt, wie aus den unveränderten Spektren dieses Farbstoffes bei der Inkubation mit den PMA- sowie Zymosan-stimulierten PMN in Anwesenheit von SOD (10µg/ml) und Katalase (200U/ml) folgt. Die nicht-stimulierten Zellen konnten ebenfalls keine Veränderungen der optischen Dichte bei 480nm hervorrufen.

Die Anwendung der Epinephrin-Methode zum Superoxidnachweis an stimulierten PMN hat zu folgenden qualitativen und quantitativen Ergebnissen geführt. Es wurde festgestellt, daß Bildung von Adrenochrom in diesem biologischen System nicht unbedingt durch eine $O_2^{\cdot-}$ -abhängige Reaktion erfolgt. Daher ist es für den Superoxidnachweis erforderlich, nur die mit SOD hemmbare Komponente der Adrenochrombildung anzurechnen.



Die mit der Epinephrin-Methode nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate ist von der Art der Stimulierung abhängig, da hier die inhomogene Verteilung der durch PMN produzierten Superoxidradikale die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate beeinflusst. Die Wiederfindungskoeffizienten für die Berechnung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate aus dem Sauerstoffverbrauch bei Zymosan- und PMA-Stimulierung wurden als 1.05 bzw. 1.49 bestimmt. Die große Streuung der Meßwerte ist auf den geringen Extinktionskoeffizienten des Adrenochroms sowie auf mögliche andere Wechselwirkungen im System zurückzuführen.

3.7.1.3 Chemilumineszenz-Methoden

3.7.1.3.1 Chemilumineszenz des Lucigenins als Maß der Superoxidbildung an PMN.

Bei der Anwendung der Chemilumineszenz des Lucigenins als Nachweismethode der $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung durch stimulierte PMN wurden die Zellen in der Konzentration von ca. 10^6 ml^{-1} im Meßpuffer suspendiert. Die Stimulation mit PMA erfolgte wie im Kapitel 2.5.1.3 beschrieben. Die zu erwartende $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde durch die Konzentration von Zellen so eingestellt, daß diese in der Größenordnung den im Xanthin/Xanthinoxidase System untersuchten Bildungsraten entsprach (Kapitel 3.5.2). Daher wurde die im Modellsystem als optimal bestimmte Konzentration des Lucigenins von 50 μM auch auf das System mit stimulierten Zellen übertragen.

Der Sauerstoffverbrauch durch die Zellen wurde vor und nach der Stimulierung unter den gleichen Bedingungen (jedoch ohne Lucigenin) in Kontrollexperimenten als Maß der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate gemessen (s. Kapitel 3.7.1.1).

Wenn die Produktion der Superoxidradikale durch die mit PMA stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen in Anwesenheit von Lucigenin gestartet wird, kann eine diesen Prozeß begleitende Chemilumineszenz beobachtet werden.

Qualitativ entspricht die Amplitude der Lucigenin-Chemilumineszenz der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate, wenn diese aus der Kinetik des Sauerstoffverbrauchs bestimmt wurde.

Die Abb. 41 zeigt, daß die Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz unter PMA-Stimulierung der Zellen deutlich zunimmt. Während einiger Minuten Äquilibrationszeit, die für die Erwärmung von Zellen auf die Meßtemperatur von 37°C notwendig ist, wurde ebenfalls eine Chemilumineszenz in Anwesenheit von Lucigenin beobachtet, jedoch von viel geringerer Intensität (Abb. 41).

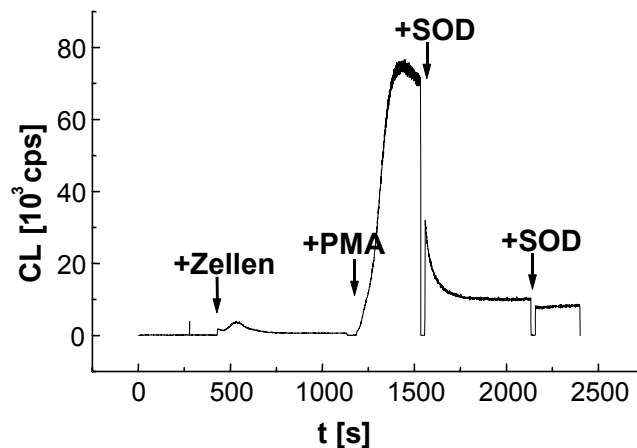


Abb. 41. Lucigenin-Chemilumineszenz von den mit PMA stimulierten Zellen. Die PMN wurden in PBS (T=37°C) mit 5mM Glucose, 1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂ und 50µM Lucigenin versetzt. Die Radikalbildung wurde durch Zugabe von PMA (80ng/ml) wie mit dem Pfeil angezeigt gestartet. Zugabe von je 10µg/ml SOD.

Ob die O₂⁻-unabhängigen Reaktionen des Lucigenins zu der beobachteten Chemilumineszenz an stimulierten Zellen beitragen, wurde aus dem Effekt des die O₂⁻-Dismutation katalysierenden Enzyms Superoxid Dismutase (SOD) abgeleitet. Wäre die registrierte Chemilumineszenz zum größten Teil durch die Reaktionen des Lucigenins mit anderen Komponenten als O₂⁻-Radikalen bedingt, dann würde die Zugabe von SOD nur eine geringe Hemmung der Intensität hervorrufen. Wäre die Chemilumineszenz hingegen ausschließlich durch die Reaktion mit O₂⁻-Radikalen zustande gekommen, dann würde SOD eine 100%-ige Hemmung der Intensität erbringen.

Wie aus Abb. 41 ersichtlich, nimmt die Chemilumineszenz des Lucigenins bei der Zugabe von SOD ab, eine 100%-ige Hemmung der Intensität konnte jedoch nicht erreicht werden (auch nicht bei Verdopplung der SOD- Konzentration (Abb. 41)). Ein Anteil der Chemilumineszenz von 20%, bezogen auf das Amplitudenmaximum erzielt ohne SOD-Zugabe, blieb SOD-insensitiv. Die Zugabe von Katalase (200U/ml) hatte keinen Einfluß, weder auf die Chemilumineszenz-Intensität noch auf die SOD-Hemmbarkeit. Daraus folgt, daß dies nicht die O₂⁻-unabhängigen Reaktionen des Lucigenins, die zur SOD-insensitiven Komponente beitragen, sind.

Dieses Ergebnis zeigt, daß der größere Teil der Chemilumineszenz (80%) an stimulierten PMN von O₂⁻-Radikalen abhängig ist. Der Beitrag von Superoxid-unabhängigen Reaktionen zur Chemilumineszenz des Lucigenins in diesem System kann mit einem Wert von höchstens 20% eingeschätzt werden, da die SOD-insensitive Komponente der Chemilumineszenz auch eine andere Ursache haben kann. Lucigenin als positiv geladenes, relativ kleines Molekül erfüllt die formellen Voraussetzungen einer intrazellulären Lumineszenzprobe und kann die äußere Zellmembran passieren. Das in die Zelle aufgenommene Lucigenin läßt sich mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisieren [116]. Hingegen ist die Zellmembran für SOD, die im Experiment in Abb. 41 zugegeben wurde, undurchlässig. Somit wäre auch die O₂⁻-abhängige Chemilumineszenz von intrazellulären Lucigenin-Molekülen mit SOD nicht hemmbar, da SOD keinen Zugang zu dem intrazellulären Raum hat.

Es ist wichtig zu bemerken, daß obwohl die stimulierten Zellen quantitativ vergleichbare O₂⁻-Bildungsraten produzieren, die für X/XOD System bereits untersucht worden sind (Kapitel 3.5.2), die Intensität der Chemilumineszenz an stimulierten PMN wesentlich höher ist, als aus der entsprechenden Chemilumineszenz-Intensität im Modellsystem zu erwarten ist (vgl. Abb.14B mit Abb. 41). In Kapitel 3.5.2 wurde die Abhängigkeit der Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz von der Superoxidbildungsrate im Xanthin/Xanthinoxidase System dargestellt (Abb. 23). Diese kann als eine Kalibrierung herangezogen werden, welche auf Grund der produzierten Superoxidbildungsrate die zu erwartende Chemilumineszenz-Intensität voraussagen läßt.

Da die Superoxidbildungsrate durch die stimulierten PMN über die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs abgeschätzt werden kann (Spalte „O₂⁻-Bildung“ in der Tabelle 5), ist es möglich, die theoretisch zu erwartende Amplitude der Lucigenin-Chemilumineszenz nach der Kalibrierung zu berechnen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in der Spalte „Theoretische Luc-CL“ (Tabelle 5) dargestellt. Werden die experimentell erhaltenen Werte der Chemilumineszenz-Intensität mit den theoretischen verglichen, dann sind die letzteren fast zwei Größenordnungen niedriger (Tabelle 5).

Tabelle 5. Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz bei der Superoxidbildung an PMN.

| O ₂ ⁻ -Bildung [µM/min] | Theor.Luc-CL [cps] | Tatsächliche Luc-CL [cps] | |
|---|--------------------|---------------------------|--------------------|
| | | ohne SOD | mit SOD |
| 2,30±0,15 (n=2) | 1 479±360 | 59 000±8 000 (n=2) | 14 000±500 (n=2) |
| 6,54±0,15 (n=2) | 3 684±360 | 114 000±4 000 (n=2) | 22 500±1 000 (n=2) |

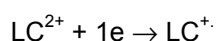
Auch wenn nur der SOD-sensitive Anteil der Chemilumineszenz berücksichtigt wird, ist die Intensität immer noch 30mal größer, als auf Grund der Kalibrierung zu erwarten ist (Tabelle 5).

Der 20%ige Beitrag von O₂⁻ -unabhängigen Reaktionen an der Chemilumineszenz des Lucigenins ist nicht ausreichend, um die mehrfache Erhöhung der Intensität in dem System mit PMN im Vergleich zu dem Modellsystem zu begründen. Andere Faktoren, welche zur hohen Intensität der Chemilumineszenz des Lucigenins an stimulierten PMN beitragen könnten, werden weiter unten betrachtet.

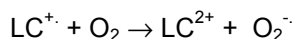
Ob diese höhere Chemilumineszenz-Intensität über eine zusätzliche durch Lucigenin stimulierte Radikalproduktion durch Zellen zu erklären ist, wurde über die zuvor als zuverlässig identifizierte Cytochrom c- Methode überprüft.

Erstens könnte Lucigenin als körperfremde Substanz eine direkte Stimulierung der PMN auslösen. Wäre das zutreffend, dann könnte die Superoxidbildung an Zellen auch durch die Zugabe von Lucigenin gestartet werden. Da es aber zu keiner Reduktion des Cytochrom c kam, wenn 50µM Lucigenin in Kontakt mit den Zellen gebracht wurde, kann die Möglichkeit einer stimulierenden Wirkung des Lucigenins auf PMN ausgeschlossen werden.

Zweitens könnte Lucigenin (LC²⁺) die Superoxidbildung an stimulierten PMN vergrößern, indem es die enzymatisch übertragenen Elektronen aufnimmt (Reaktion 34) und dann autooxidiert (Reaktion 35), wobei die zusätzlichen Superoxidradikale gebildet werden können:



Reaktion 34



Reaktion 35

Unter der Stimulierung von PMN wird nicht nur die NADPH-Oxidase, sondern auch eine Reihe von Enzymen aktiviert, welche Elektronen auf Lucigenin übertragen und dadurch eine zusätzliche (zur NADPH-Oxidase) Superoxidbildung vermitteln könnten.

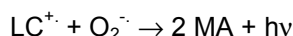
Die intrazelluläre NO-Synthase ist potentiell in der Lage, Lucigenin direkt zu reduzieren. Einerseits ist die Aktivierung dieses Enzyms an den PMA-stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen bekannt [39]. Andererseits ist ein gleichartiges Enzym, die endotheliale NO-Synthase, in der Lage, Elektronen auf Lucigenin direkt zu übertragen und dadurch zur Bildung der ohne Lucigenin nicht vorhandenen Superoxidradikale nach dem oben beschriebenen Mechanismus zu führen [148]. Daher ist es nicht auszuschließen, daß auch die intrazelluläre NO-Synthase ebenfalls Elektronen auf Lucigenin, wie Reaktion 34 beschreibt, überträgt. Die O₂⁻ -Bildungsrate wäre dadurch vergrößert und die Intensität der Chemilumineszenz somit erhöht.

Ob dieser Prozeß für die erhöhte Lucigenin-Chemilumineszenz im PMN-System verantwortlich ist,

wurde experimentell überprüft. Hierfür wurden die PMN in An- und Abwesenheit von 50µM Lucigenin mit PMA stimuliert und in beiden Fällen die Reduktion von Cytochrom c (100µM) gemessen. Da keine signifikanten Veränderungen der Reduktionsrate von Cytochrom c in Anwesenheit von Lucigenin festgestellt wurden, konnte auch diese mögliche Erklärung für die hohe Chemilumineszenz- Amplitude abgelehnt werden.

Die Gesamtreaktion der Chemilumineszenz des Lucigenins (Reaktion 20) weist darauf hin, daß für die Bildung eines lumineszierenden Moleküls Methylacridon insgesamt zwei Elektronen und ein Sauerstoffmolekül benötigt werden. Ein Superoxidradikal kann jedoch nur eine univalente Reduktion vermitteln, so daß für die Bildung eines Methylacridon- Moleküls zwei nacheinander folgenden Reduktionen durch Superoxidradikale erforderlich sind.

Wenn andere Komponenten des Systems ein Elektron auf Lucigenin übertragen und somit einen von zwei notwendigen Reduktionsschritten durchführen, verändern sich die Reaktionstöchiometrie und der kinetische Ablauf. So könnte die Reaktion zwischen dem in der Reaktion 34 enzymatisch reduzierten Lucigenin (LC^{+}) und dem Superoxidradikal



Reaktion 36

die Intensität der Chemilumineszenz dadurch erhöhen, daß in der Reaktionssequenz Reaktion 34+Reaktion 36 statt zwei nur ein $O_2^{\cdot -}$ -Molekül für die Bildung eines lumineszierenden Moleküls Methylacridon (MA) benötigt wird (vgl. Reaktion 20). Außerdem kann die Reduktion des Lucigenins LC^{2+} zum Lucigenin-Kationradikal LC^{+} schneller durch ein Enzym (Reaktion 34) ablaufen, als durch Superoxidradikale. Dadurch steigt die limitierende Geschwindigkeit der Reaktion 34, die Bildungsrate des Methylacridons und somit die Intensität der Chemilumineszenz. Da in dem oben betrachteten Schema ein von zwei Reduktionsschritten durch das Superoxidradikal erfolgt, bleibt die Chemilumineszenz des Lucigenins auch in diesem Fall SOD-sensitiv.

Die enzymatische Übertragung von Elektronen auf Lucigenin kann durch Diphenyleniodoniumchlorid (DPI), einen irreversiblen Inhibitor von Flavoprotein-Reduktasen und somit von Superoxid generierender NADPH-Oxidase sowie NO-Synthase, verhindert werden. Die Lucigenin-Chemilumineszenz, einschließlich des SOD-insensitiven Anteils, konnte durch DPI vollständig gehemmt werden (Abb. 42).

Um einen möglichen Einfluß von DPI auf den Chemilumineszenz-Mechanismus des Lucigenins ausschließen zu können, wurde seine Wirkung auf die Chemilumineszenz im Xanthin/Xanthinoxidase System überprüft, wo die $O_2^{\cdot -}$ -Produktion mit DPI nicht gehemmt wird. Hier hatte DPI keinen Einfluß auf die Chemilumineszenz, so daß eine Wechselwirkung von DPI mit einer Komponente des Nachweisystems auszuschließen ist.

Die Lebensdauer der Moleküle im angeregtem Zustand sowie die Quantenausbeute von Lumineszenzreaktionen kann auch durch die Eigenschaften des Mediums beeinflusst werden. Das Lösungsmittel kann eine Verschiebung des Chemilumineszenzspektrums hervorrufen. Das Emissionsspektrum des Methylacridons, des lumineszierenden Reaktionproduktes reduktiver Oxygenierung von Lucigenin (s. Reaktion 20), liegt im sichtbaren Bereich (400-500nm), wo die Empfindlichkeit des hier verwendeten Photomultipliers von der Wellenlänge praktisch unabhängig ist. Aus diesem Grund kann die spektrale Verschiebung der Emission von ca. 24nm [131], die bei Änderung der Polarität des Mediums von der wässrigen zur Lipidphase zu erwarten ist, nicht die Ursache der hohen registrierten Intensität der Chemilumineszenz im System mit PMN sein.

Wie die oben beschriebenen Experimente gezeigt haben, wird die Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz beim Nachweis der Superoxidbildung an stimulierten PMN nicht nur durch die Superoxidbildungsrate bestimmt. Die Verteilung des Lucigenins zwischen intra- und extrazellulärem Raum, Wechselwirkungen mit den Lipidmembranen und mit den elektronübertragenden Enzymen stellen die möglichen für dieses System spezifischen Einflüsse auf die Chemilumineszenz-Intensität dar. Dies kann zu falschen Schlußfolgerungen über die durch PMN produzierte $O_2^{\cdot -}$ -Bildungsrate führen.

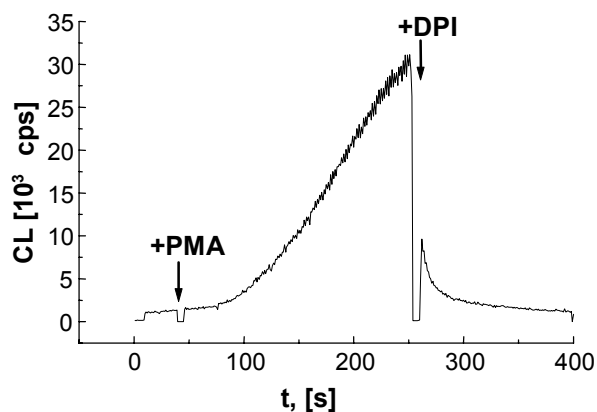


Abb. 42. Hemmung der Lucigenin-Chemilumineszenz an PMA-stimulierten PMN durch Diphenyliodoniumchlorid (DPI). Reaktionsbedingungen wie in Abb. 41 angegeben. Konzentration von DPI betrug 15 μ M.

3.7.1.3.2 Luminol-Chemilumineszenz und die Radikalbildung an PMN.

Die nächste Methode, die für den Nachweis der Superoxidbildung an stimulierten PMN angewendet wurde, war die Chemilumineszenz des Luminols. Die PMN wurden im Meßpuffer in der gleichen Konzentration, wie in den Experimenten mit Lucigenin, suspendiert (s. Kapitel 0). Die Superoxidbildungsrate, die über den Sauerstoffverbrauch unter der PMA-Stimulierung bestimmt wurde, lag in dem Bereich, der für das Xanthin/Xanthinoxidase System mit der Luminol-Methode untersucht wurde. Die Konzentration des Luminols von 50 μ M wurde vom Modellsystem auf stimulierte Zellen übertragen.

Wenn polymorphkernige Neutrophile in Anwesenheit des Luminols mit PMA stimuliert werden, kommt es zur Entstehung eines Chemilumineszenzsignals. Die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz im Falle stimulierter PMN war ca.300mal höher, als die im Xanthin/Xanthinoxidase System, und ca.10mal höher als in Experimenten mit Lucigenin, obwohl in allen Fällen die realen Superoxidbildungsraten

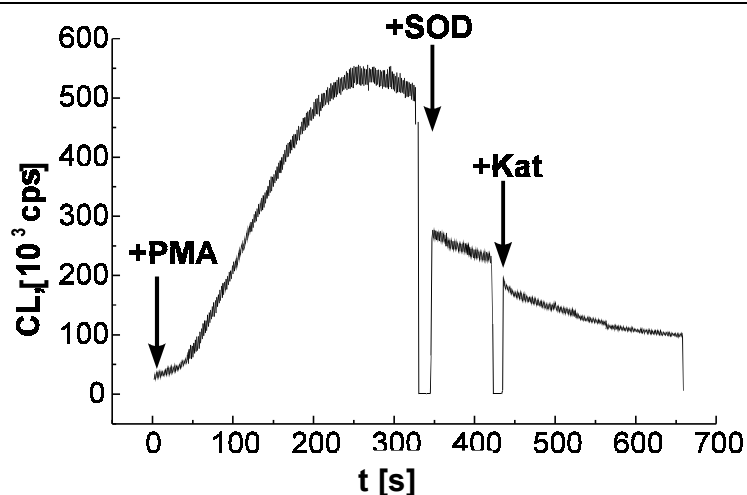


Abb. 43. Einfluß der SOD und Katalase auf die Luminol-Chemilumineszenz der PMA-stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen. Die PMN wurden in PBS (T=37°C) mit 5mM Glucose, 1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂ und 50 μ M Luminol versetzt. Die Radikalbildung wurde durch Zugabe von PMA (80ng/ml) wie mit dem Pfeil angezeigt gestartet. Zugabe von 10 μ g/ml SOD und 200U/ml Katalase.

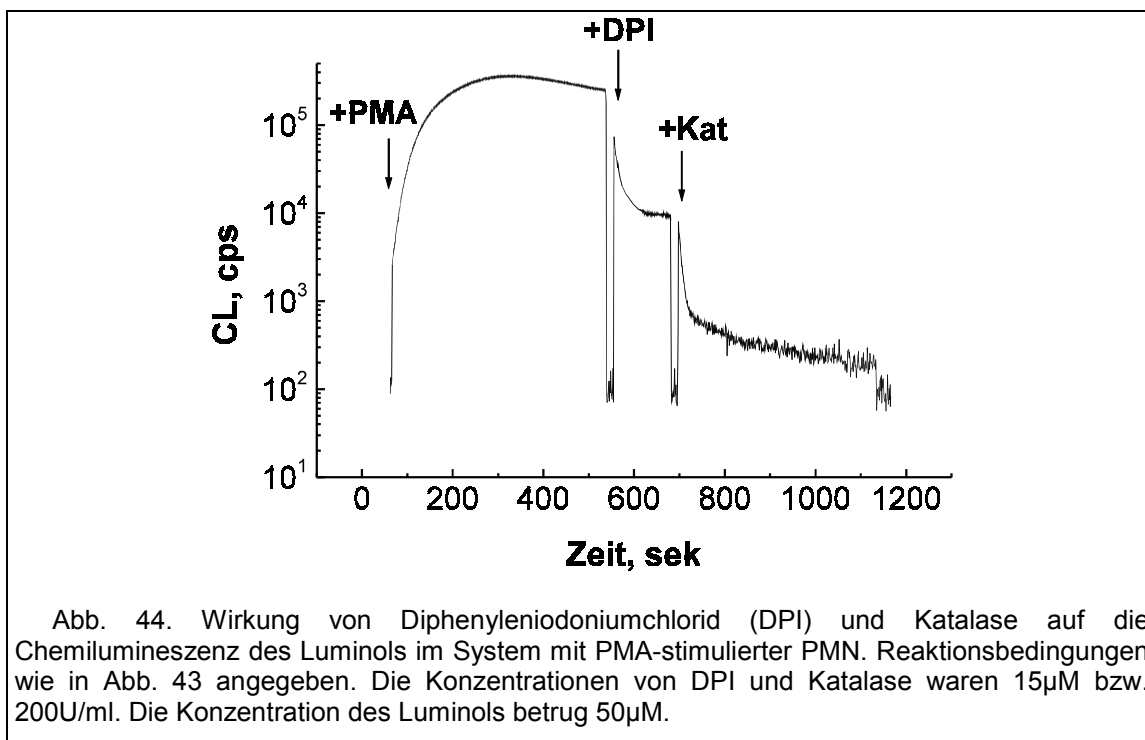


Abb. 44. Wirkung von Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) und Katalase auf die Chemilumineszenz des Luminols im System mit PMA-stimulierter PMN. Reaktionsbedingungen wie in Abb. 43 angegeben. Die Konzentrationen von DPI und Katalase waren 15µM bzw. 200U/ml. Die Konzentration des Luminols betrug 50µM.

vergleichbar waren. Die Chemilumineszenz war nur teilweise mit SOD hemmbar (Abb. 43). Die nachfolgende Zugabe von Katalase trug zu einer weiteren Hemmung bei, obwohl eine völlige Hemmung nicht erreicht werden konnte (Abb. 43).

Diphenyleniodoniumchlorid, ein Hemmstoff der NADPH-Oxidase an PMN, hatte ebenfalls eine hemmende Wirkung (Abb. 44), was für die Beteiligung an der Chemilumineszenz dieses $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden Enzyms spricht. In diesem Fall erbrachte die nachfolgende Zugabe von Katalase eine 100%-ige Hemmung der Chemilumineszenz (Abb. 44).

Die 300fache Erhöhung der Amplitude der Chemilumineszenz im System mit stimulierten PMN im Vergleich zu dem Modellsystem bei der gleichen $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate weist auf Reaktionen des Luminols mit anderen Oxidantien als Superoxidradikale hin. Die unvollständige Hemmbarkeit mit SOD ist ein zusätzlicher Beweis hierfür. Die weitere Hemmung der Intensität mit Katalase zeigt die Beteiligung von Wasserstoffperoxid an der Chemilumineszenzreaktion an.

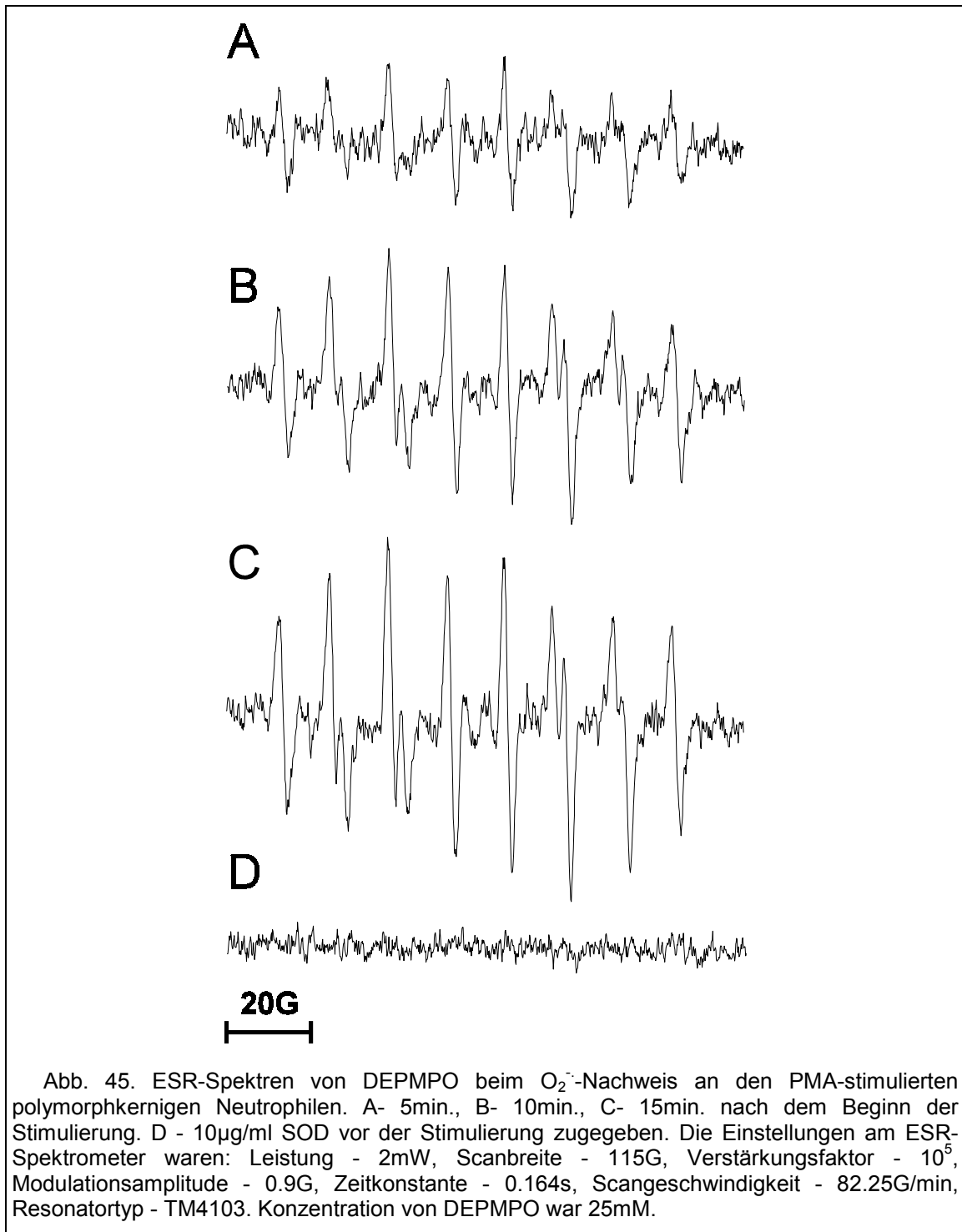
Wasserstoffperoxid kann entweder über die Bildung von Hydroxylradikalen oder über die Myeloperoxidase (MPO) zur Chemilumineszenz beitragen. Für letztere dient es als Substrat und fördert somit die Bildung des starken Oxidationsmittels Hypochlorit (Reaktion 27). Die Chemilumineszenz des Luminols bei Reaktionen mit Hydroxylradikalen [88] sowie mit Hypochlorit in Anwesenheit von H_2O_2 [9,10] ist bekannt. Aus dem Experiment mit Diphenyleniodoniumchlorid (Abb. 44) wird deutlich, daß der Chemilumineszenzsignal nicht vollkommen verschwindet, wenn die Superoxidbildung an stimulierten PMN mit DPI gehemmt wurde. Der verbliebene DPI-insensitive Anteil der Chemilumineszenz ist auf die von Wasserstoffperoxid abhängigen Reaktionen zurückzuführen, weil dieser mit Katalase vollkommen hemmbar war.

Die Untersuchungen der Superoxidbildung an den mit PMA stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen über die Chemilumineszenz des Luminols haben erwiesen, daß die Intensität hauptsächlich durch andere Reaktionen als die mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen bestimmt wurde. Wasserstoffperoxid ist an der Entwicklung der Chemilumineszenz wesentlich beteiligt. Somit kann die Chemilumineszenz des Luminols nicht als eine Methode für den selektiven $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an PMN betrachtet werden.

3.7.1.4 ESR-Nachweis der $O_2^{\cdot -}$ -Bildung an stimulierten PMN.

Für die Untersuchung der Radikalbildung an PMN wurden die Zellen in Anwesenheit des für den $O_2^{\cdot -}$ - Nachweis geeigneten Spintraps DEPMPO durch die Zugabe von PMA stimuliert. Um die optimale Temperatur für die Aktivität der NADPH-Oxidase zu gewährleisten, wurde die ESR-Meßzelle während der Messung bei 37°C thermostatiert.

Wie die Abb. 45 zeigt, wurde hauptsächlich ein für das DEPMPO-OOH-Addukt charakteristisches



Signal in Anwesenheit stimulierter Zellen beobachtet. Die Amplitude des Signals nahm solange zu,

wie die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen durch PMN andauerte.

Mit Zugabe von SOD vor dem Beginn der Stimulation konnte die Bildung des Adduktes vollkommen gehemmt werden (Spektrum D auf der Abb. 45).

Die Radikalbildung durch stimulierte Zellen ist zeitlich begrenzt. Die Dauer dieses Prozesses wurde aus der Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Cytochrom c-Reduktion abgeleitet und beträgt ca. 15min (vgl. Abb. 34). Diese Tatsache wurde für die Einschätzung der Stabilität des DEPMPO-Adduktes in diesem System genutzt.

Die PMN wurden über 15min nach der Stimulierung in der ESR-Meßzelle inkubiert, bis die Radikalbildung aufhörte. Von diesem Moment an wurde keine weitere Zunahme der Signalintensität des DEPMPO-OOH-Adduktes registriert und die Zerfallskinetik über die Amplitude des mittleren Dubletts aufgenommen (Abb. 46). Die Aufnahme des ESR-Spektrums nach Ablauf der kinetischen Messung ergab, daß nur die Intensität des Signals abnimmt, ohne daß das Spektrum sich verändert.

Wurde die Zerfallskinetik als Reaktion pseudo-erster Ordnung modelliert, dann ergab die Halbwertszeit τ des DEPMPO-OOH-Adduktes einen Wert von 1389 ± 166 s. Vergleicht man diesen Wert mit dem $\tau = 1280 \pm 355$ s, der im enzymatischen Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase erhalten wurde (Kapitel 3.6.2), dann wird ersichtlich, daß die Stabilität des Adduktes sich in Anwesenheit der PMN kaum verändert. Somit hatte auch die Erhöhung der Meßtemperatur auf 37°C , bei der alle ESR-Spektren von stimulierten Zellen aufgenommen wurden, keinen wesentlichen Einfluß auf die Zerfallsgeschwindigkeit.

Die Untersuchungen der Radikalbildung an stimulierten PMN mit Hilfe des neuen Spintraps DEPMPO zeigen, daß hauptsächlich Superoxid- und nicht Hydroxylradikale in diesem System gebildet werden.

Die genaue Identifizierung der produzierten Radikalspezies mit dem bisher für diese Fragestellung angewandten Spintrap DMPO war problematisch, da das DMPO-OH-Addukt nicht nur über die Reaktion mit OH-Radikalen, sondern auch als Zerfallsprodukt des DMPO-OOH-Adduktes gebildet wird (Reaktion 24).

Da Wasserstoffperoxid als Dismutationsprodukt der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale entsteht, kann die Reaktion zwischen Superoxid und einem Spintrap mit der Dismutationsreaktion konkurrieren und die Bildung von Wasserstoffperoxid und schließlich von Hydroxylradikalen vermindern. Die höhere Stabilität des DEPMPO-OOH-Adduktes ermöglicht die Anwendung einer niedrigeren Konzentration von DEPMPO als von DMPO. Bei einer fast gleichen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von DMPO und DEPMPO mit Superoxidradikalen beeinflusst das letztere die Bildung des Wasserstoffperoxides und daher die Bildung der OH-Radikale weniger.

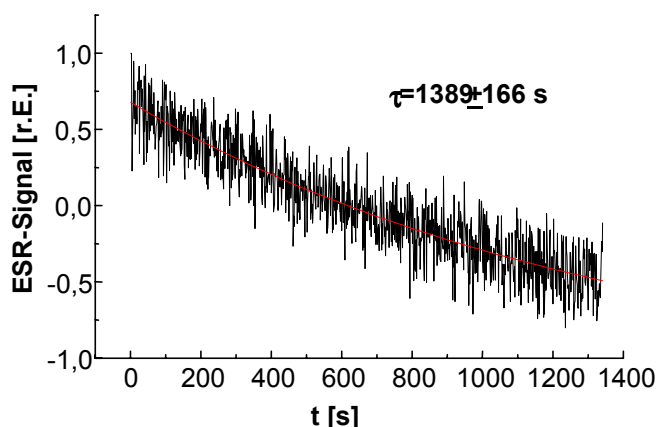


Abb. 46. Stabilität des DEPMPO-OOH Adduktes in Anwesenheit von PMN. Die Amplitude des mittleren Dubletts wurde bei konstantem Magnetfeld über die Zeit gemessen. Die Einstellungen des ESR-Spektrometers waren wie in Abb. 45 angegeben.

Die Anwendung des Spintrap DEPMPO zum Nachweis von Superoxidradikalen an stimulierten PMN ist vielversprechend. Das charakteristische ESR-Spektrum ermöglicht eine eindeutige Zuordnung des Signals und somit die Identifikation des Superoxides. Die Stabilität des DEPMPO-OOH-Adduktes wird durch die Meßtemperatur von 37°C kaum beeinflusst, so daß die geringeren Konzentrationen des Spintraps für ein detektierbares ESR-Signal ausreichend sind.

3.7.2 Mitochondrien.

Die Radikalbildung durch Mitochondrien wird in Zusammenhang mit den Ischämie-Reperfusionsschäden [84,109], mit dem Alterungsprozeß [96,102], mit der Toxizität verschiedener Pharmaka [53] sowie im Zusammenhang mit bestimmten Erbkrankheiten [44] untersucht. Die besondere Aufmerksamkeit der Forscher gilt speziell diesen Zellorganellen, da Mitochondrien den weitaus größten Teil des zellulären Sauerstoffes verbrauchen. Je nach Zelltyp fließen mehr als 90% des gesamten in der Zelle vorhandenen Sauerstoffes in die mitochondriale Atmungskette ein.

Mitochondrien kommen in allen pflanzlichen und tierischen Zellen vor. Es sind von einer äußeren und inneren Membran umschlossene Funktionseinheiten, die der Bildung biologischer Energieträger (ATP) dienen. Die äußere einfach gebaute Membran ist nur für Moleküle mit einer Größe unter 5000 Dalton frei permeabel. Die innere Membran kann nur mit Hilfe von speziellen Transportproteinen für einen Stoffaustausch zwischen dem inneren Raum (Matrix), in dem der Stoffwechsel stattfindet, und dem

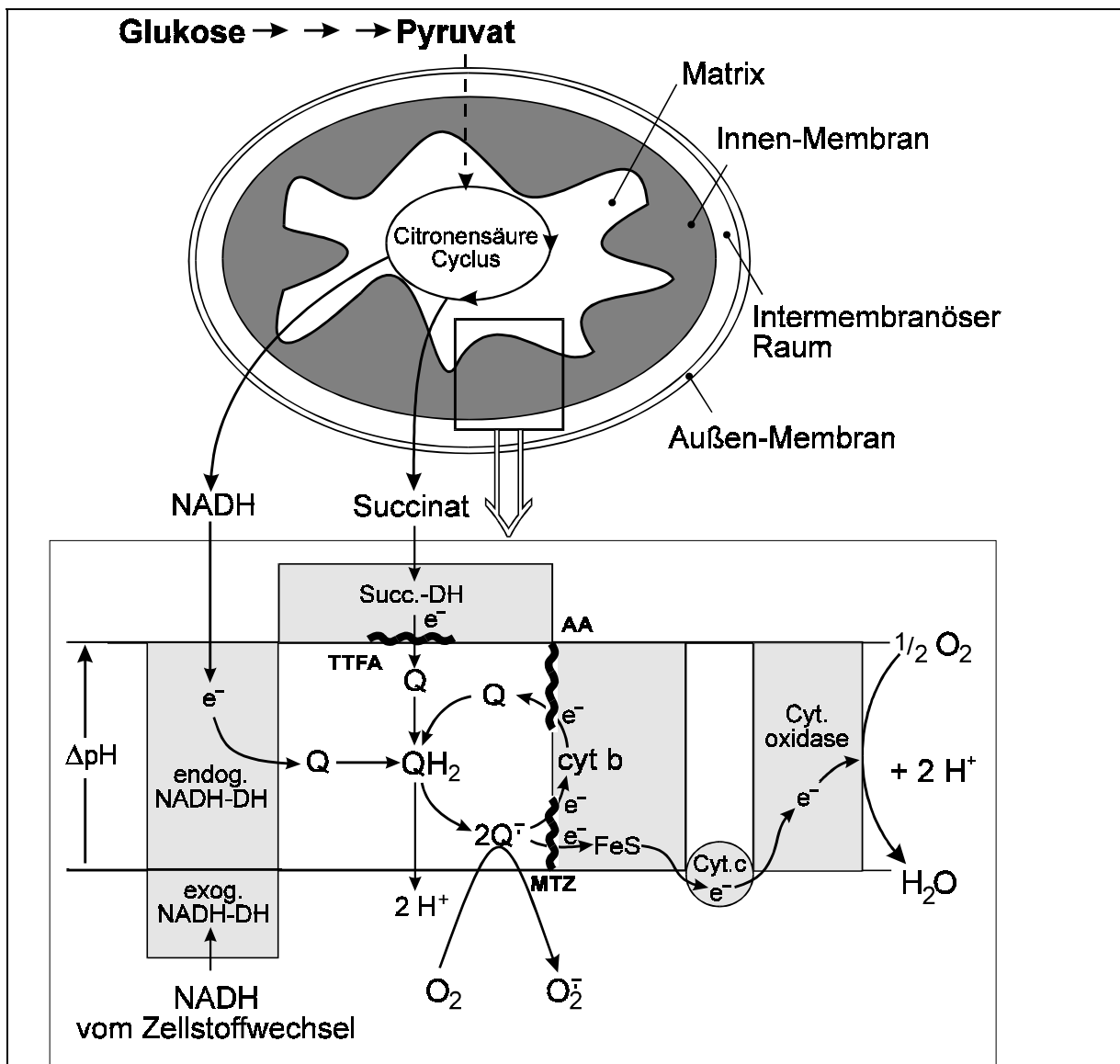


Abb. 47. Schematische Darstellung des morphologischen Aufbaus und der Elektronentransportkette in Mitochondrien (mit Modifizierungen nach [97]). Abkürzungen: DH - Dehydrogenase, Q - Ubiquinon, FeS - Eisen-Schwefel Protein, AA - Antimycin A, MTZ - Myxothiazol, TTFA- Thenoyltrifluoroacetone. Im Schema der Atmungskette ist der Elektronenfluß mit Pfeilen gekennzeichnet.

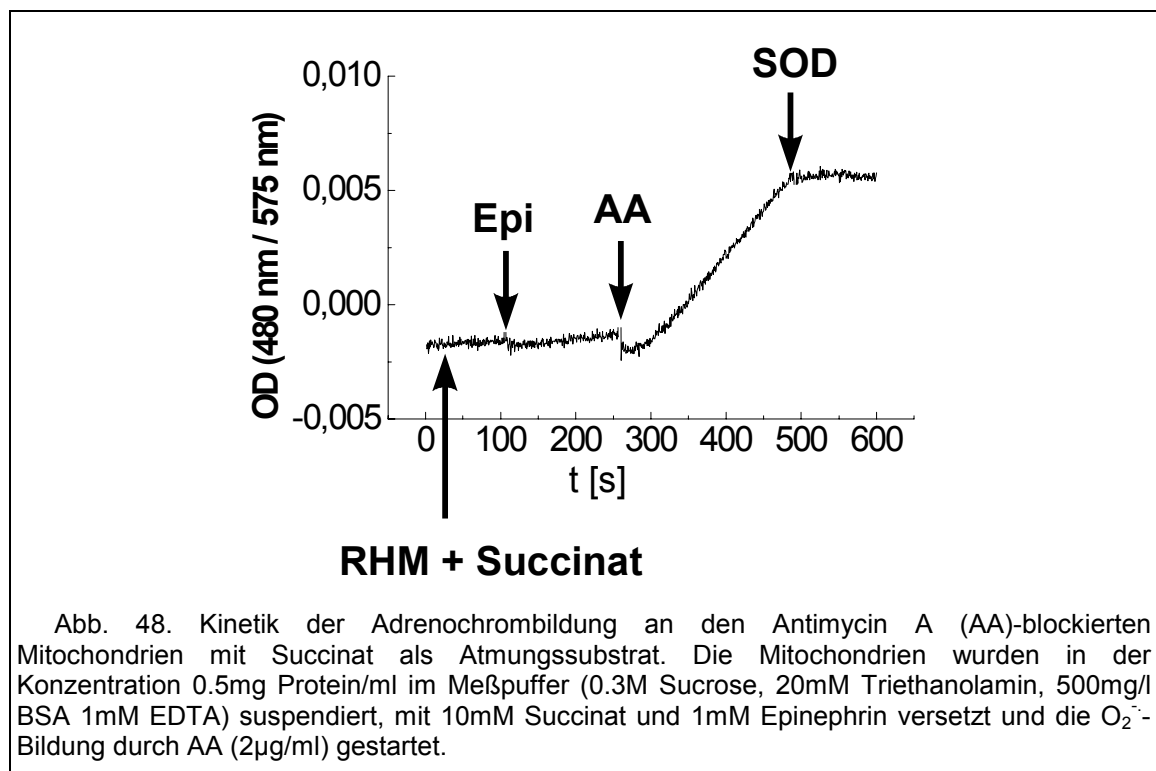
mit dem Cytoplasma der Zelle kommunizierenden Intermembranraum überwunden werden (s. Abb. 47). Die hierfür sowie für alle biologischen Leistungen erforderliche Energie wird durch die mit der inneren Membran assoziierten Komponenten der Atmungskette bereitgestellt. Die Energieträger hierfür sind verschiedene Metabolite des Zitronensäurezyklus (Succinat, NADH, FADH). Diese werden über die Komponenten der Atmungskette schrittweise oxidiert, wobei molekularer Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor dient. Die stufenweise freigesetzte Energie wird in Form einer energiereichen Phosphatbindung im ATP-Molekül fixiert (oxidative Phosphorylierung).

Die ATP-Bildung ist somit an die Oxidation des Substrates gebunden (oder *gekoppelt*).

Die Voraussetzung für eine möglichst effiziente Umsetzung der bei der Oxidation frei werdenden Energie in den biologischen Energieträger ATP ist der kontrollierte Elektronen-Transport über die Transportmoleküle der Atmungskette. Der Elektronen-Transfer erfolgt durch Einzelelektronenschritte bis hin zur Cytochromoxidase, wo der Sauerstoff solange fest gebunden bleibt, bis nacheinander 4 Elektronen übertragen worden sind. Nach der Protonierung wird der reduzierte Sauerstoff in Form von Wasser in den Zellkörper (Zytoplasma) freigesetzt. Da Sauerstoff wegen seiner Elektronenkonfiguration Elektronen nur einzeln aufnehmen kann, ist schon lange vermutet worden, daß auf der Reduktionsseite der Cytochromoxidase Elektronen durch andere Komponenten der Atmungskette direkt auf das O_2 -Molekül übertragen werden können, wodurch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale entstehen.

Die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung in der mitochondrialen Atmungskette wurde erstmals bei der Hemmung von Atmung an Cytochrom b durch Antimycin A (AA) nachgewiesen [78] (siehe Abb. 47). Unter diesen Bedingungen akkumulieren die Elektronen auf der Reduktionsseite des Cytochrom b, so daß sich in diesem Abschnitt der Atmungskette alle Elektronen-Carrier in voll reduziertem Zustand befinden. Thermodynamisch sind in Anwesenheit von Antimycin A die Elektronen-Carrier in der Lage, O_2 -Moleküle univalent zu reduzieren.

Die spontane oder pathophysiologisch induzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildung über die mitochondriale Atmungskette wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert [99,101,106,132], während einheitlich von allen Autoren die AA-induzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildung bestätigt wird. Daher wurde diese Bedingung der mitochondrialen $O_2^{\cdot-}$ -Bildung als Standard für die Beurteilung der Eignung der in der Literatur verwendeten Nachweismethoden gewählt.



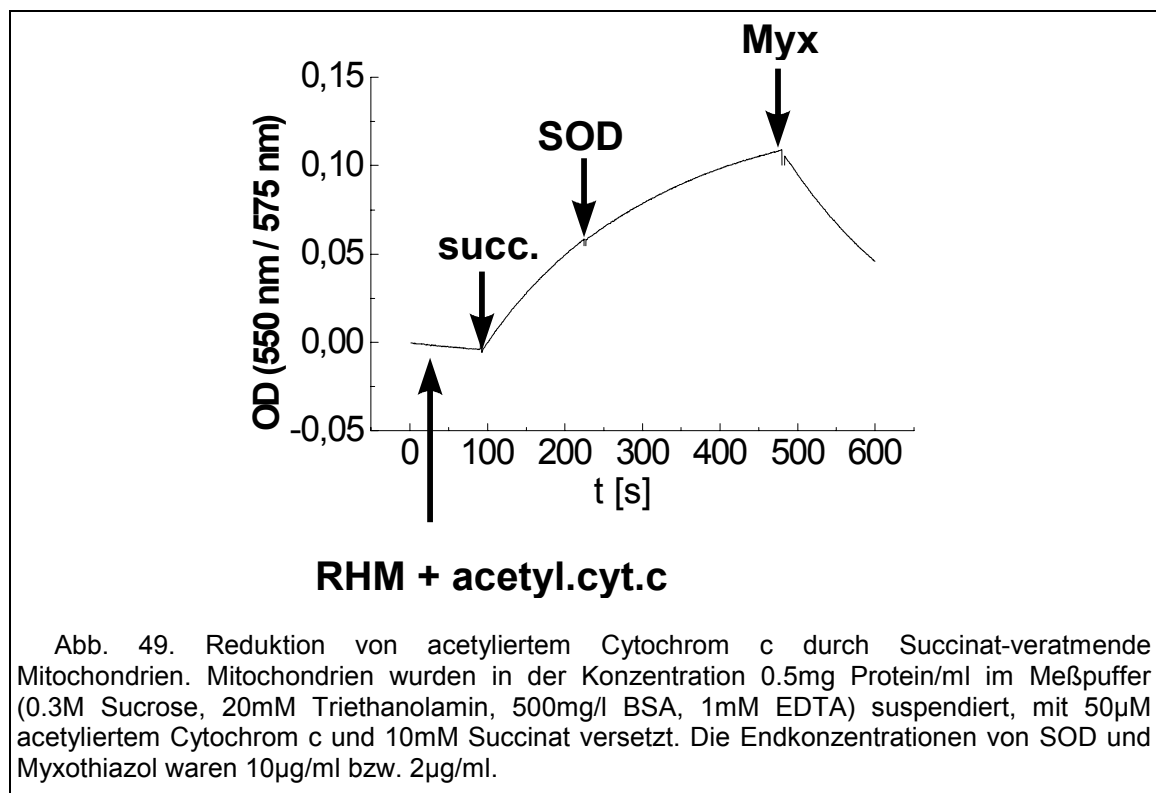
3.7.2.1 Anwendung von Farbstoffen zum Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an Mitochondrien.

Von drei im Modellsystem getesteten Farbstoffen - Cytochrom c, Epinephrin und Nitroblau Tetrazolium - kommen prinzipiell nur Cytochrom c und Epinephrin in Betracht, wenn die Superoxidradikalbildung an Mitochondrien untersucht werden soll.

NBT ist für den Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung an Mitochondrien ungeeignet, da ein Enzymkomplex (Succinat-Dehydrogenase) bekannt ist, der Elektronen direkt auf NBT überträgt [1,8,37]. Die Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Reduktion übersteigt die Reduktion durch mitochondrial gebildete $O_2^{\cdot-}$ -Radikale um den Faktor 100 oder mehr. Außerdem können sich die wasserunlöslichen Reaktionsprodukte (Formazane) in der mitochondrialen Membran anlagern und dadurch die Superoxidbildung beeinflussen. Im weiteren wurde der Nachweis der Superoxidbildung mit den beiden erwähnten Farbstoffen, Cytochrom c und Epinephrin, an Mitochondrien durchgeführt.

Die Superoxidbildung an Mitochondrien wurde durch die Zugabe von Antimycin A während der Succinatatmung in Gang gesetzt (nach [78]). In den parallel durchgeführten Experimenten wurden stets die Atmungsparameter und die Kopplungskonstante der Mitochondrien kontrolliert (s. Kapitel 2.5.2.2).

Ein typischer kinetischer Verlauf der $O_2^{\cdot-}$ -abhängigen Adrenochrombildung an Mitochondrien bei Anwendung von Epinephrin zeigt Abb. 48. Mitochondrien (RHM) wurden in der Konzentration von 0.5mg Protein/ml in dem Meßpuffer suspendiert, mit 10mM Succinat und 1mM Epinephrin versetzt. Die das Succinat veratmenden Mitochondrien verursachten vor dem Zusatz von Antimycin A keine wesentlichen Veränderungen der optischen Dichte bei 480 nm. Erst wenn Antimycin A zugegeben wurde, konnte die für Adrenochrom charakteristische Zunahme der optischen Dichte bei 480nm beobachtet werden. Mit Zugabe von SOD konnte die Adrenochrombildung vollkommen gehemmt werden.



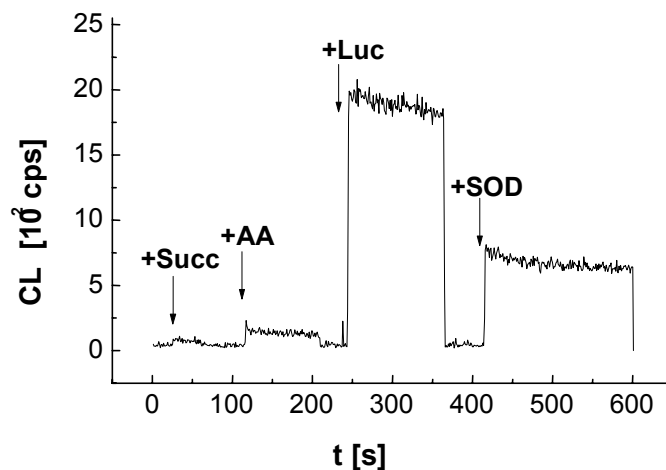


Abb. 50. Lucigenin-Chemilumineszenz an $O_2^{\cdot-}$ -bildenden Mitochondrien (RHM). Effekt von SOD. RHM wurden in der Konzentration 0.5mg Protein/ml im Meßpuffer suspendiert, mit 10mM Succinat versetzt und die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch Antimycin A (AA, 2 μ g/ml) gestartet. Die Konzentration des Lucigenins war 50 μ M. Die Endkonzentration von SOD betrug 10 μ g/ml.

Eine andere Kinetik ergibt sich, wenn acetyliertes Cytochrom c zum Superoxidnachweis an Mitochondrien eingesetzt wurde. Die Acetylierung des Cytochroms erschwert seinen Umsatz durch mitochondriale Enzyme, läßt aber seine Reaktivität mit Superoxidradikalen praktisch unverändert.

Wie die Abb. 49 jedoch zeigt, wurde eine Zunahme der optischen Dichte bei 550nm, die für Cytochrom c-Reduktion charakteristisch ist, beobachtet noch bevor die Superoxidbildung an RHM gestartet wurde (Abb. 49). Die Reduktion des Cytochroms erfolgte bei der Succinat-Atmung der Mitochondrien und war unabhängig davon, ob Antimycin A zugegeben wurde oder nicht. Da SOD keinen Einfluß auf die Reduktionsrate hatte (Abb. 49), muß die Reaktion ohne Beteiligung von Superoxidradikalen ablaufen. Einen weiteren Beweis dafür, daß acetyliertes Cytochrom c direkt durch

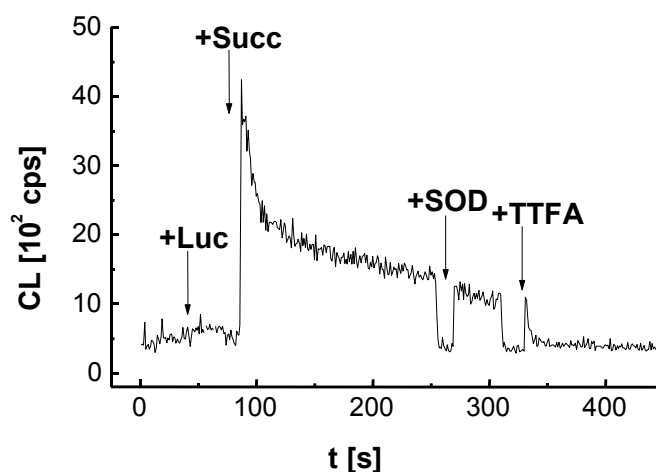


Abb. 51. Einfluß des Hemmstoffes TTFA auf den SOD-insensitiven Anteil der Lucigenin-Chemilumineszenz beim Superoxid-Nachweis an Mitochondrien (RHM). Die Induktion der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch RHM erfolgte wie in Abb. 50 angegeben. Die Endkonzentrationen von SOD und TTFA waren 10 μ g/ml bzw. 1mM.

die Komponenten der Atmungskette reduziert wird, ergibt sich aus der Tatsache, daß Myxothiazol, ein Hemmstoff der mitochondrialen Atmung (s. Abb. 47), die weitere Reduktion verhindern konnte. Außerdem wurde eine Oxidation des vorher reduzierten Cytochrom c nach der Zugabe von Myxothiazol beobachtet.

Diese Wechselwirkung zwischen den Mitochondrien und dem Nachweisfarbstoff läßt sich interpretieren, wenn der Aufbau der mitochondrialen Atmungskette einbezogen wird.

Cytochrom c ist eine natürliche Komponente der Atmungskette (s. Abb. 47). Während der Succinat-Atmung fließen Elektronen entlang der Atmungskette und werden durch die entsprechende Reduktase auf mitochondriales Cytochrom c übertragen, von dem sie weiter durch Cytochrom-Oxidase auf Sauerstoff übertragen werden (Abb. 47). Wenn jedoch Cytochrom c als Nachweissubstanz extra zugegeben wird, dann können die Elektronen aus der Atmungskette nicht nur auf mitochondriales, sondern auch auf exogen zugegebenes Cytochrom c übergehen. Dies entspricht der beobachteten, gegenüber SOD insensitiven Reduktion von Cytochrom c in Anwesenheit von Succinat.

Wird der Elektronentransport entlang der Atmungskette durch Myxothiazol blockiert (s. Abb. 47), bleibt mitochondriales Cytochrom c oxidiert. In diesem Fall können die stark oxidierten Cytochromoxidasen der Atmungskette auch exogenes reduziertes Cytochrom c als Substrat nutzen, wobei exogenes reduziertes Cytochrom c oxidiert wird. Dies erklärt die Abnahme der optischen Dichte bei 550nm nach der Zugabe von Myxothiazol.

Obwohl die Acetylierung des Cytochroms den enzymatischen Umsatz verhindern soll, ist eine 100%-ige Acetylierung praktisch nicht erreichbar. In den kommerziell erworbenen Reagenzien sind nur ca. 60% der Lysinreste des Cytochroms acetyliert.

Auf Grund der hier dargestellten Untersuchungen kann geschlossen werden, daß der Beitrag der enzymatisch bedingten Reduktion des Cytochroms über die superoxidabhängige Reduktion dominiert, so daß letztere nicht erfaßt werden kann.

3.7.2.2 Chemilumineszenz-Untersuchungen der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an Mitochondrien.

Für Chemilumineszenzuntersuchungen der Superoxidbildung an RHM wurden diese in der Konzentration von 0.5mg Protein/ml in dem Meßpuffer (s. Kapitel 2.5.2.1) suspendiert und mit dem Atmungssubstrat Succinat (10mM) versetzt. Die im Kapitel 3.5.2 bestimmte optimale Konzentration des Lucigenins von 50µM wurde auch in diesem System eingesetzt. Die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen an Mitochondrien wurde durch Zugabe des Hemmstoffes Antimycin A in Gang gesetzt (Abb. 47 und Erläuterungen im Kapitel 3.7.2)

Wenn die Superoxid-Bildung an Mitochondrien in Anwesenheit des Lucigenins gestartet wurde, konnte eine Chemilumineszenz beobachtet werden (Abb. 50). Die Succinat-Atmung ohne Antimycin A wurde nicht durch erhöhte Chemilumineszenz begleitet. Obwohl Lucigenin als spezifische Probe für Superoxidradikale angesehen wird, war seine Chemilumineszenz in diesem System nur zum Teil mit SOD hemmbar (Abb. 50). Der Einsatz höherer Konzentrationen von SOD führte zu keiner weiteren Hemmung.

Um den Ursprung der gegenüber SOD insensitiven Komponente zu klären, wurde der Einfluß verschiedener Hemmstoffe der Atmung auf die Chemilumineszenz untersucht. Da die Bildung des lumineszierenden Produktes bei der Lucigenin-Chemilumineszenz die Aufnahme zweier Elektronen und eines O_2 -Moleküls erfordert, besteht die Möglichkeit einer direkten Elektronenübertragung von der Atmungskette auf Lucigenin und anschließender Reaktion mit Superoxid.

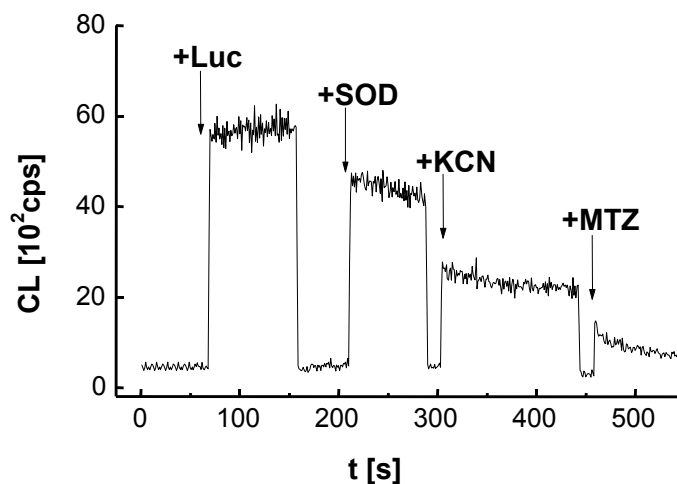


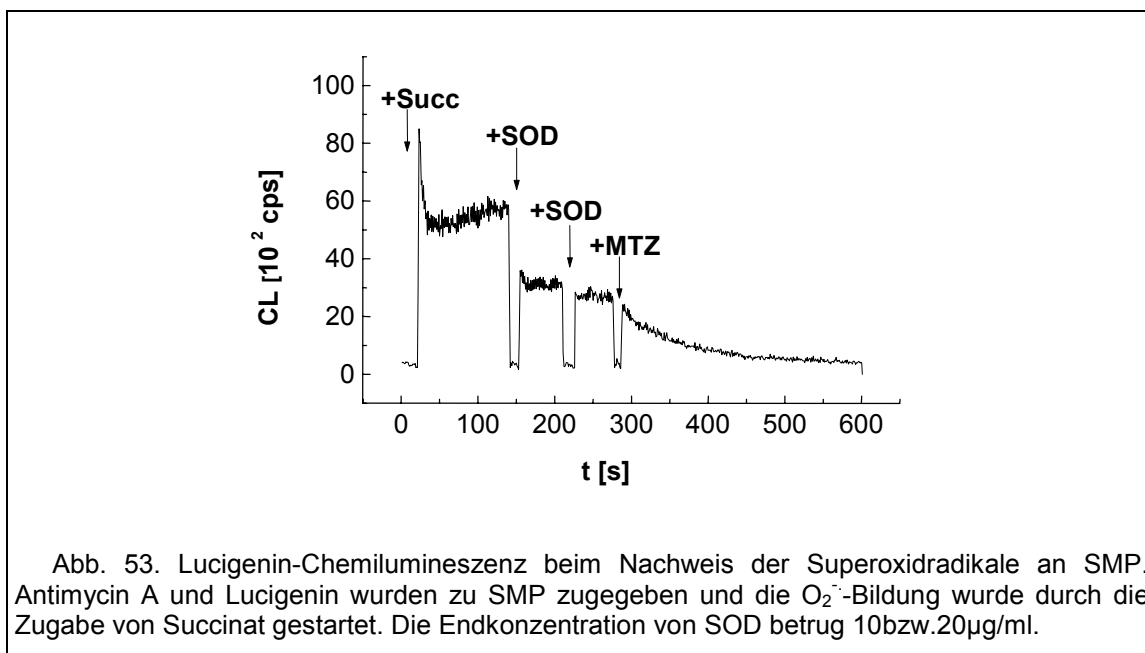
Abb. 52. Wirkung der Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette (Kaliumcyanid, Myxothiazol) auf den SOD-insensitiven Anteil der Lucigenin-Chemilumineszenz beim Superoxid-Nachweis an Mitochondrien. Probenzusammensetzung: 0.5mg Protein/ml RHM, 10mM Succinat, 2µg/ml Antimycin A, 50µM Lucigenin, 10µg/ml SOD, 1mM Kaliumcyanid, 2µg/ml Myxothiazol

Wie in Abb. 51 dargestellt, konnte der Hemmstoff Thenoyltrifluoroacetone (TTFA), der den Elektronenfluß von der Succinat-Dehydrogenase zu den nachfolgenden Komponenten der Atmungskette blockiert (Abb. 47), die gegen SOD insensitive Komponente der Lucigenin-Chemilumineszenz hemmen. Zur Überprüfung, ob TTFA durch einen atmungsunabhängigen hemmenden Effekt auf die Lucigenin-Chemilumineszenz wirkt, wurden die Kontrollexperimente im Xanthin/Xanthinoxidase System durchgeführt. Diese ergaben, daß TTFA keine ausgeprägte hemmende Wirkung auf die Lucigenin-Chemilumineszenz in diesem Modellsystem hat. Daher wurde die an Mitochondrien beobachtete Hemmung durch TTFA ausschließlich der Blockierung der Atmungskette zugeordnet.

Kaliumcyanid (KCN), ein Hemmstoff der Atmungskette an der Stelle der Cytochromoxidase (Abb. 47), trug ebenfalls zu einer weiteren Hemmung der gegen SOD insensitive Komponente der Lucigenin-Chemilumineszenz an den Superoxid produzierenden Mitochondrien bei (Abb. 52). Eine 100%-ige Hemmung wurde mit diesem Hemmstoff jedoch nicht erreicht (maximale Konzentration 4mM). Die restliche SOD- und KCN-unabhängige Chemilumineszenz des Lucigenins konnte durch die Zugabe von Myxothiazol eliminiert werden.

Ob die beiden Hemmstoffe eine unspezifische Auswirkung auf die Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz haben, wurde durch die Experimente im Xanthin/Xanthinoxidase System untersucht. Weder Kaliumcyanid (1mM) noch Myxothiazol (2µg/ml) in den Konzentrationen, wie für die Experimente an Mitochondrien eingesetzt, konnten die Intensität der Chemilumineszenz im Modellsystem beeinflussen. Dies beweist, daß die Wirkung von Kaliumcyanid und Myxothiazol auf die Hemmung des Elektronentransportes zurückzuführen ist.

Der komplizierte morphologische Aufbau der Mitochondrien ermöglicht keine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse. Die teilweise SOD-Hemmbarkeit der Lucigenin-Chemilumineszenz kann verschiedene Ursachen haben. Erstens kann die Chemilumineszenz nicht ausschließlich durch Wechselwirkung des Lucigenins mit Superoxidradikalen zustande kommen. Eine direkte Übertragung zweier Elektronen aus der Atmungskette auf das Lucigenin-Molekül mit radikalischer Addition eines Sauerstoffmoleküls würde die formellen stöchiometrischen Anforderungen einer von Chemilumineszenz begleiteten Lucigenin-Reaktion erfüllen. Zweitens könnten die produzierten Superoxidradikale mit Lucigenin im Intermembranraum reagieren, zu dem ein großes SOD-Molekül jedoch keinen Zugang hat. Die exogen zugegebene SOD könnte in diesem Fall nur den Teil der Lucigenin-Chemilumineszenz löschen, der den aus den Mitochondrien freigesetzten $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen zugeordnet werden kann, während die Chemilumineszenz aus dem Zwischenmembranraum unbeeinflusst bliebe.



Um diese Probleme zu klären, wurden Experimente zur Superoxidbildung an submitochondrialen Partikeln (SMP) durchgeführt. Die SMP bestehen aus geschlossenen Fragmenten der Innenmembran, besitzen keine Außenmembran und verfügen deshalb über keine Restriktion für den Zugang von SOD zu dem Intermembranraum. Der Elektronentransport der Atmungskette bleibt in den SMP ungestört erhalten und die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung kann - genauso wie an Mitochondrien - durch Antimycin A und Succinat in Gang gesetzt werden.

Wäre der morphologische Aufbau der Mitochondrien der einzige Grund für die Existenz der gegen SOD insensitiven Komponente, dann sollte die Lucigenin-Chemilumineszenz beim Superoxid-Nachweis an SMP vollkommen mit SOD hemmbar sein. Wie Abb. 53 jedoch zeigt, ist die Lucigenin-Chemilumineszenz auch beim Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale an SMP nur teilweise mit SOD hemmbar. Myxothiazol konnte hingegen die gegen SOD insensitive Komponente hemmen, so daß ein Teil der Chemilumineszenz auf eine direkte Reduktion des Lucigenins durch die Atmungskette zurückgeführt werden kann.

Somit kann die Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz nicht zur Beurteilung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung an Rattenherzmitochondrien dienen, da vermutlich eine direkte Reduktion durch die Komponenten der Atmungskette zur Chemilumineszenz beiträgt.

3.7.2.3 Spintrapping-Technik zum Nachweis von $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an Mitochondrien.

Der neue Spintrap DEPMPO wurde zum Nachweis der Superoxidradikalbildung an RHM unter der klassischen Bedingung - Succinat-Atmung an den durch Antimycin A gehemmten Mitochondrien [78] - angewendet. In den Kontrollexperimenten wurde untersucht, ob DEPMPO in der für die ESR-Messungen eingesetzten Konzentration einen Einfluß auf die Atmungsparameter der Mitochondrien (s. Kapitel 2.5.2.2) hat. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. Einfluß des Spintraps DEPMPO auf die Atmungsparameter von Mitochondrien.

| Parameter | Kontrolle | +2mM DEPMPO |
|---------------------------------|-----------|-------------|
| Atmungszustand 4, nmol O/min/mg | 21,10 | 19,73 |
| Atmungszustand 3, nmol O/min/mg | 162,39 | 143,59 |
| RC | 7,70 | 7,28 |
| P/O | 2,40 | 2,46 |

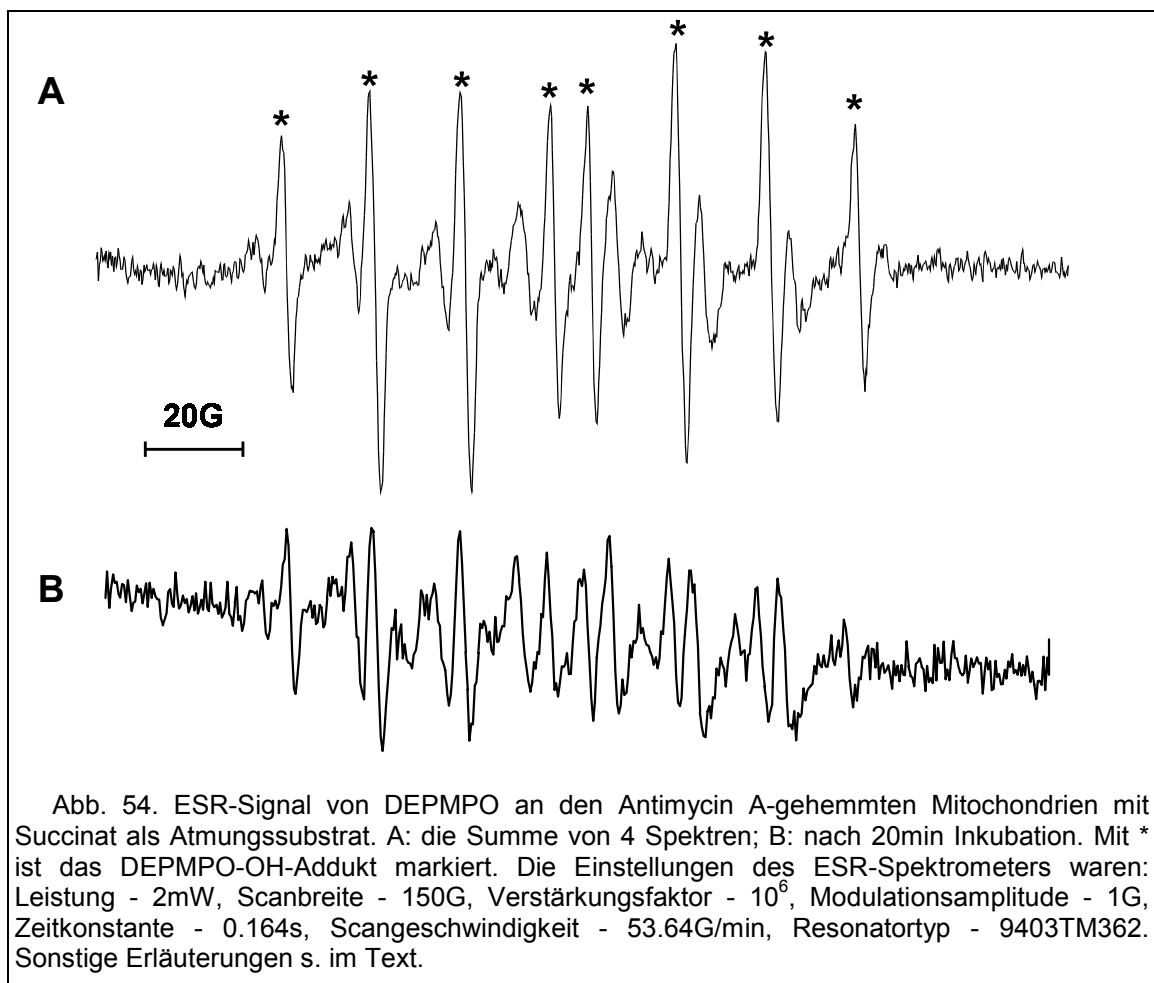
Wie die Atmungsparameter zeigen (Tabelle 6), hat DEPMPO in millimolarer Konzentration keine toxische Wirkung auf die Mitochondrien und beeinflusst nicht die Effizienz der Phosphorylierung.

Um die Superoxidbildung an RHM zu initiieren, wurden die Mitochondrien (5.55mg Protein/ml) mit Succinat (100mM) versetzt und der Hemmstoff der mitochondrialen Atmung, Antimycin A (20 μ g/ml), zugegeben. Nach 5min Inkubation dieser Mischung mit 25mM DEPMPO unter Sauerstoffbegasung wurde sie in die ESR-Meßzelle umgefüllt und die ESR-Spektren aufgenommen. Eine Sättigung des Meßpuffers mit Sauerstoff war notwendig, um eine für die Identifizierung der Addukte ausreichende Intensität des ESR-Signals zu erhalten.

Das in Abb. 54 dargestellte ESR-Signal stellt das Ergebnis der Summierung von vier nacheinander aufgenommenen Spektren dar. Das ESR-Spektrum kann einer Mischung verschiedener Addukte zugeschrieben werden, von denen das dominante die Aufspaltungskonstanten des DEPMPO-OH-Adduktes aufweist ($a_H=13.24$ G, $a_N=14.02$ G, $a_P=47.15$ G). Das Differenz-Spektrum konnte wegen der geringeren Signalintensität nicht eindeutig identifiziert werden, könnte aber auch dem DEPMPO-OOH-Addukt zuzuschreiben sein.

Das DEPMPO-OH-Addukt ist jedoch in Anwesenheit von RHM instabil. Wie Abb. 54B zeigt, nimmt die Intensität des ESR-Signals von diesem Addukt nach 20min deutlich ab, obwohl im Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase das gleiche Addukt stabil blieb (s. Kapitel 3.6.2). Vermutlich wird die Stabilität des DEPMPO-OH-Adduktes durch die Wechselwirkungen mit den Komponenten der mitochondrialen Atmungskette beeinflusst. Das Fehlen eines deutlichen Signals des DEPMPO-OOH-Adduktes an $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden Mitochondrien ist eventuell auf dieselben Wechselwirkungen zurückzuführen.

Die Applikation des neuen Spintraps DEPMPO zum $O_2^{\cdot-}$ -Radikalnachweis an Mitochondrien hat folgende Ergebnisse gebracht. Die Konzentrationen von DEPMPO, die für ein detektierbares ESR-



Signal eingesetzt werden müssen, sind für Mitochondrien nicht toxisch. Das ESR-Signal des DEPMPO-OH-Adduktes konnte sicher identifiziert werden, wenn RHM durch Hemmung mit Antimycin A zur $O_2^{\cdot -}$ -Bildung gebracht wurden. Der Mangel an detektierbarem DEPMPO-OOH-Addukt sowie die Instabilität des DEPMPO-OH-Adduktes sind vermutlich auf die Wechselwirkung mit der mitochondrialen Atmungskette zurückzuführen.

4 Diskussion.

$O_2^{\cdot-}$ -Radikale sind Metabolite biologischer Prozesse. Wenn ihre Bildung aus endogener oder exogener Ursache übermäßig stimuliert wird, ist das natürliche enzymatische und nicht-enzymatische Schutzsystem nicht mehr ausreichend, um oxidative Schäden biologischer Strukturen zu verhindern. Es entwickelt sich das Bild des „oxidativen Stresses“, dem bei vielen Erkrankungen eine pathogene Bedeutung zukommt. Initiatormolekül des oxidativen Stress-Geschehens ist der univalent reduzierte Sauerstoff, das Superoxidradikal. Bestimmte biologische Funktionseinheiten sind u.U. in der Lage, dieses Initialereignis in die Wege zu leiten, so daß es erforderlich ist, Bedingungen und Ausmaß der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an diesen biologischen Systemen zu studieren. Obwohl es eine relativ große Anzahl von Nachweismethoden für $O_2^{\cdot-}$ -Radikale gibt, ist die Detektion an biologischen Systemen mit einer großen Unsicherheit behaftet. Von einer zuverlässigen Methode wird erwartet:

- 1) daß die Anwesenheit des Nachweisproduktes das Auftreten der Superoxid-Radikale anzeigt (qualitativer Aspekt)
- 2) daß auch die Bildungsrate der Superoxidradikale nachgewiesen werden kann (quantitativer Aspekt)

Die quantitative Kalibrierung der Methoden erfordert eine Radikalbildungsquelle mit klar definierbarer $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate. Ein solches System ist jedoch nicht verfügbar. Annäherungsweise konnte dieses Problem mit dem Xanthin/Xanthinoxidase System gelöst werden, da sich bei Kenntnis der Reaktionsstöchiometrie aus dem Sauerstoffverbrauch und dem Auftreten des oxidierten Elektron-Donators (Harnsäure) die $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten errechnen lassen.

4.1 Vor- und Nachteile des Xanthin/Xanthinoxidase Systems als $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle.

Um die verschiedenen Detektionsverfahren vergleichbar zu machen, war es erforderlich, diese mit Hilfe einer definierten und reproduzierbaren $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle zu eichen. Um die Bewertung der Superoxid-Nachweismethoden mit Bezug auf ihre biologische Anwendbarkeit zu ermöglichen, muß die verwendete Bildungsquelle Superoxidradikale in wässrigem Medium bei physiologischem pH-Wert produzieren. Weitere zu fordernde Eigenschaften der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle sind:

- 1) gut steuerbare und quantitativ nachvollziehbare $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten;
- 2) sie sollte chemisch inert sein;
- 3) sie sollte eine homogene Verteilung der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Radikale sicherstellen.

Je nach Fragestellung werden verschiedene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquellen in der Forschung eingesetzt (Tabelle 7). Methoden der photo- und elektrochemischen, enzymatischen, radiolytischen sowie chemischen Produktion der Superoxidradikale sind in der Literatur beschrieben [2,19,24,59,60,77,146].

Da Superoxid-Radikale in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert schnell dismutieren, werden sie gewöhnlich in einem stabilisierenden alkalischen oder aprotischen Medium erzeugt. Um eine konstante $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle zu erhalten, wird die elektrochemisch oder chemisch erzeugte Superoxidlösung mit konstanter Geschwindigkeit unter ständigem Rühren in die Probe infundiert. Der Nachteil dieser Methoden ist die Instabilität der Superoxid-Stammlösung sowie die quantitativ schlecht nachvollziehbare $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate (Tabelle 7).

Im Fall der photochemischen oder radiolytischen $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung ist eine Interaktion der entsprechenden Strahlung mit dem Detektionssystem nicht auszuschließen. Die enzymatische $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch das Xanthin/Xanthinoxidase System entspricht den oben genannten Anforderungen nur teilweise, ermöglicht aber die Einstellung unterschiedlicher Bildungsrate sowie die quantitative Abschätzung der freigesetzten $O_2^{\cdot-}$ -Menge.

Tabelle 7. **Eignung verschiedener Superoxidbildungsquellen für die quantitative Bewertung der Nachweismethoden.**

| Art der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung | Reaktion | Bedingungen (s. oben) erfüllt? | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----|----|
| | | 1) | 2) | 3) |
| Chemisch | KO_2 in Kronenäther, $(MeN)O_2$ | + | ++ | — |
| Photochemisch | Photolyse, Flavine, Tetrapyrrole | + | — | ++ |
| Enzymatisch | Xanthin/Xanthinoxidase | ++ | ++ | ++ |
| Elektrochemisch | O_2 –Reduktion | + | — | — |
| Radiolytisch | β -Strahlung | — | — | + |

Die Frage, ob bei der Elektronenübertragung auf Sauerstoff durch Xanthinoxidase nur Superoxidradikale entstehen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [76,79,150]. Da Wasserstoffperoxid als Dismutationsprodukt der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale stets im System vorhanden ist, ist es schwer zu unterscheiden, ob H_2O_2 auch durch direkte Xanthinoxidase-katalysierte Übertragung zweier Einzelelektronen oder nachfolgender Dismutation der primär gebildeten $O_2^{\cdot-}$ -Radikale oder beide zugleich entstehen.

Katalase, die dem Xanthin/Xanthinoxidase System stets zugegeben wurde, eliminiert das H_2O_2 , so daß nur $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in der Lösung weiter existierten.

Obwohl ein Teil der durch Xanthinoxidase übertragenen Elektronen in die Bildung von Wasserstoffperoxid gemäß dem genannten Mechanismus einfließen kann, wird der Anteil der in die Superoxidbildung fließenden Elektronen als konstant postuliert, wenn die Bildungsrate der Harnsäure im Bereich 1-12 μ M/min liegt.

Auch die Bildung von Hydroxyl-Radikalen wurde dem Xanthin/Xanthinoxidase System zugeschrieben [17,68]. Die genauere Analyse ergab jedoch, daß diese nur als sekundäres Produkt aus H_2O_2 in Anwesenheit von katalytischen Spuren von Übergangsmetallen (u.a. Eisen) in einer Fenton-Typ-Reaktion entstehen [30,76]. Wurde Eisen mit Hilfe von DTPA (1mM) aus dem Reaktionssystem herauscheliert sowie H_2O_2 durch Katalase eliminiert, dann konnte die Hydroxylradikalbildung im Xanthin/Xanthinoxidase System völlig unterdrückt werden.

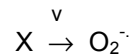
Dies wurde experimentell mittels Spintrapping-Experimenten mit DEPMPO in dem Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase überprüft. Spintrapping mit DEPMPO ermöglicht eine Differenzierung zwischen Hydroxyl- und Superoxidradikalen, da die entsprechenden Addukte stabil sind und unterschiedliche ESR-Spektren ergeben (Kapitel 3.6). Die ESR-Experimente haben gezeigt, daß keine Hydroxylradikale neben dem Superoxid in dem Modellsystem gebildet werden, wenn dem Reaktionssystem Eisenchelatoren und Katalase zugesetzt wurden (Abb. 27).

Somit ermöglicht das erarbeitete Modellsystem aus Xanthin/Xanthinoxidase, DTPA und Katalase die Bildung der Superoxidradikale in definierten Raten, so daß verschiedene Methoden des qualitativen und quantitativen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises miteinander verglichen werden konnten.

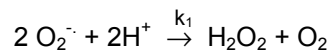
4.2 Anwendbarkeit der photometrischen Methoden.

Die photometrischen Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen sind methodisch am unkompliziertesten, daher werden sie am häufigsten in der biologischen Forschung eingesetzt. Das Meßprinzip beruht darauf, daß $O_2^{\cdot-}$ -Radikale mit einer Nachweissubstanz reagieren, die nachfolgend in ein farbiges Reaktionsprodukt umgewandelt wird.

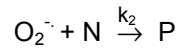
Um die qualitativen und quantitativen Aspekte des photometrischen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises zu analysieren, betrachten wir ein vereinfachtes Modell. Dieses besteht aus einer Superoxidradikalquelle **X**, welche $O_2^{\cdot-}$ -Radikale mit der Geschwindigkeit **v** produziert (Reaktion 37), und aus einer Nachweissubstanz **N**, die mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen reagiert, wobei ein photometrisch nachweisbares Reaktionsprodukt **P** entsteht (Reaktion 39). Neben dieser Nachweisreaktion können $O_2^{\cdot-}$ -Radikale auch über die spontane Dismutationsreaktion aus dem System verschwinden (Reaktion 38).



Reaktion 37



Reaktion 38



Reaktion 39

Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 38 wurde bei physiologischem pH-Wert unter der Berücksichtigung des Anteils protonierter Superoxidradikale in Kapitel 3.3.1 errechnet ($k_1 = 5 \cdot 10^5 M^{-1} s^{-1}$).

Um die Konzentrationen aller Komponenten im Verlauf der Reaktionen zu beschreiben, müssen kinetische Differenzialgleichungen angesetzt werden:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = v - k_1 S^2 - k_2 SN \\ \frac{dP}{dt} = k_2 SN \end{cases}$$

Gleichung 12

wobei **S** und **N** - die Konzentrationen der $O_2^{\cdot -}$ -Radikale bzw. der Nachweissubstanz sind.

Ist die Geschwindigkeitskonstante k_2 für die Nachweissubstanz groß genug, um mit der Spontandismutation zu konkurrieren, d.h. $k_2 SN \gg k_1 S^2$, dann kann $k_1 S^2$ vernachlässigt werden. Unter dieser Bedingung für den stationären Zustand gilt:

$$\frac{dS}{dt} \approx v - k_2 SN = 0 \text{ und daher}$$

$$\boxed{\frac{dP}{dt} = k_2 SN = v}$$

Gleichung 13

Gleichung 13 zeigt, daß die Bildungsrate des Reaktionsproduktes der Superoxidbildungsgeschwindigkeit **v** bei photometrischem Nachweis gleich ist, wenn das Reaktionsprodukt **P** stabil und die Reaktion von $O_2^{\cdot -}$ -Radikalen mit der Nachweissubstanz **N** schneller als die Dismutation ist. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, gibt es jedoch je nach dem Objekt, an welchem $O_2^{\cdot -}$ -Radikale nachzuweisen sind, und je nach Nachweissubstanz mehr oder weniger ausgeprägte quantitative und/oder qualitative Abweichungen von Gleichung 13.

Da beim photometrischen Nachweis die Bildungsrate des Reaktionsproduktes $\frac{dP}{dt}$ über die

Veränderung der optischen Dichte $\frac{dA_\lambda}{dt}$ gemessen wird (Gleichung 1), wird die Empfindlichkeit einer photometrischen Methode (im Sinne der minimal detektierbaren Superoxidbildungsrate v_{\min}) hauptsächlich durch den Extinktionskoeffizienten ϵ_λ des nachweisbaren Reaktionsproduktes sowie durch die Empfindlichkeit des Spektrophotometers bestimmt:

$$v_{\min} = \left(\frac{dP}{dt} \right)_{\min} = \frac{1}{\epsilon_{\lambda} \cdot l} \left(\frac{dA_{\lambda}}{dt} \right)_{\min}$$

Gleichung 14

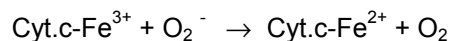
worin $\left(\frac{dA_{\lambda}}{dt} \right)_{\min}$ - die minimale detektierbare Veränderung der optischen Dichte ist. Je höher der Extinktionskoeffizient ϵ_{λ} eines Reaktionsproduktes ist, um so empfindlicher ist das Detektionssystem.

4.2.1 Cytochrom c.

4.2.1.1 Qualitative Selektivität.

Cytochrom c wird durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale reduziert, was über die Änderung der optischen Dichte bei 550nm verfolgt wurde. Der Reaktionsmechanismus der Reduktion von Cytochrom c besteht in der Übertragung eines Elektrons vom Superoxidradikal auf das Häm-Eisen des Cytochroms (Reaktion 40).

Aus thermodynamischer Sicht ist die Reaktion zwischen dem Cytochrom c und Superoxid günstig. Da das Standardredoxpotential E^0 für die Reduktion von Cytochrom c +260mV beträgt [33], während das entsprechende Redoxpotential für die Reduktion des Sauerstoffs zum Superoxid $E^0 = -330mV$ ist [33], weist die gesamte Reaktion



Reaktion 40

ein ΔE^0 von 590mV=(260-(-330))mV auf. Damit eine chemische Reaktion spontan ablaufen kann, muß die Veränderung der Gibbs'schen freien Energie ΔG (Gleichung 15) negativ sein.

$$\Delta G = -nF \Delta E$$

Gleichung 15

Diese Bedingung ist für die Reaktion 40 annähernd erfüllt ($\Delta E^0 = 590mV > 0$).

Wie die Experimente an den Superoxid-produzierenden Systemen Xanthin/Xanthinoxidase (Abb. 3) sowie stimulierten PMN (Abb. 33) bestätigt haben, wird Cytochrom c leicht durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale reduziert. Die Reduktion von Cytochrom c in biologischen Systemen ist jedoch nicht immer die Folge der Superoxidbildung. So kann Cytochrom c neben den Superoxidradikalen auch durch bestimmte zelluläre Enzyme reduziert werden [105]. Da Cytochrom c auch eine elektronenübertragende Funktion in der mitochondrialen Atmungskette hat, können Elektronen der Atmungskette das als Nachweissubstanz zugesetzte Cytochrom c auch direkt reduzieren, so daß es zu einem Anstieg der Absorption bei 550nm auch ohne Vorhandensein von Superoxidradikalen kommt [28].

Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, die enzymatische Reduktion des Cytochrom c durch Derivatisierung des Moleküls zu verhindern. Succinylierung der Lysin-Reste von Cytochrom c macht dieses unempfindlicher gegenüber Redoxsystemen der mikrosomalen Elektronentransportkette [69], während Acetylierung der Lysin-Reste das Cytochrom unanfälliger gegen Oxidation oder Reduktion durch mitochondriale Enzyme macht [11].

Der Versuch, die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung an intakten Mitochondrien mit acetyliertem Cytochrom c nachzuweisen, hat jedoch ergeben, daß die mitochondriale Atmungskette auch acetyliertes Cytochrom c direkt reduziert (Abb. 46), so daß der Beitrag der durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale vermittelten Reduktion mit diesem Nachweissystem nicht meßbar war.

Obwohl der Umsatz des Cytochroms durch mitochondriale Enzyme mit der Zunahme seines Acetylierungsgrades sinkt [94], ist seine Anwendbarkeit zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an Mitochondrien auf diese Weise nicht zu verbessern, da die reduzierte Form des Cytochroms mit Acetylierung $\geq 60\%$ instabil ist und autooxidiert [71].

Ob die Reduktion von Cytochrom c in einem System durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale erfolgt, lässt sich mit Hilfe des Enzyms Superoxid Dismutase (SOD) überprüfen. SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidradikalen (Kapitel 3.2), so daß der über $O_2^{\cdot-}$ -Radikale reduzierte Anteil des Cytochrom c durch SOD voll hemmbar wird. Daher kann eine SOD-hemmbar reduzierte Cytochrom c als Beweis für die stattfindende Bildung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in einem zu untersuchenden System gelten.

Ist die Reduktion des Cytochrom c nicht meßbar oder SOD-insensitiv, dann kann dennoch eine Superoxidbildung in dem System nicht ausgeschlossen werden, da die am Elektronentransport beteiligten Komponenten (Enzyme) direkt mit der Nachweissubstanz (Cytochrom c) in Wechselwirkung treten können [28,91,105].

Das durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale reduzierte Cytochrom c kann enzymatisch sowie nicht-enzymatisch oxidiert werden, was zu einer Verminderung bis hin zur völligen Beseitigung des nachweisbaren Reaktionsproduktes führen kann. Wasserstoffperoxid kann beispielsweise reduziertes Cytochrom c oxidieren [48,71], die hierfür erforderliche Konzentration ist jedoch viel höher, als sie unter physiologischen Bedingungen erzeugt werden kann [142]. Hydroxylradikale, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit können ebenfalls zur nicht-enzymatischen Oxidation des reduzierten Häm-Eisen des Cytochroms beitragen [71,130,137]. Die Oxidation von reduziertem Cytochrom durch PMN (Abb. 36) oder durch die mitochondriale Atmungskette in Anwesenheit von Myxothiazol (Abb. 46) sind Beispiele für die Beseitigung des photometrischen Nachweisproduktes.

Somit kann die $O_2^{\cdot-}$ -vermittelte Reduktion von Cytochrom c durch eine gleichzeitig ablaufende Oxidation kompensiert werden, so daß trotz vorhandener Superoxidbildung kein reduziertes Cytochrom c (oder nur eine verminderte Menge, s. unten) nachweisbar ist.

4.2.1.2 Quantitative Ausbeute.

Die quantitative Ausbeute einer Nachweismethode wurde in der vorliegenden Arbeit über einen Wiederfindungskoeffizienten charakterisiert. Dieser ist ein Proportionalitätskoeffizient, der die nachgewiesene mit der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate ins Verhältnis setzt. Der Superoxidnachweis mit der Cytochrom c-Methode im Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystem ergab einen Wiederfindungskoeffizienten von 0.365 (Abb. 3), d.h. 36.5% des gesamten durch Xanthinoxidase umgesetzten Sauerstoffs konnte in Form von Superoxid nachgewiesen werden. Das reduzierte Cytochrom c bleibt in dem Modellsystem stabil; daher kann das oben erarbeitete Modell für die Erklärung des Wiederfindungskoeffizienten eingesetzt werden.

Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen Cytochrom c und Superoxid ist mit $2.6 \cdot 10^5 M^{-1} s^{-1}$ groß genug, um die Dismutationsreaktion zu vernachlässigen, wenn eine ausreichende Konzentration des Cytochroms eingesetzt wird. Bei der Konzentration N von Cytochrom $\geq 50 \mu M$ ist die Bedingung $k_2 SN \gg k_1 S^2$ erfüllt. Somit kann die Spontandismutation der Superoxidradikale keinen wesentlichen Einfluß auf den Wiederfindungskoeffizienten haben. Experimentell wurden keine zusätzlichen Nebenreaktionen, weder der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale noch des reduzierten Cytochrom c in dem Modellsystem, registriert, welche die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate und folglich den Wiederfindungskoeffizienten vermindern können (Kapitel 3.4.1.).

Eine Erklärung des von 1 abweichenden Wiederfindungskoeffizienten im Modellsystem ergibt sich aus Besonderheiten der Xanthinoxidase als $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsquelle. Wenn die Superoxidradikale in einer für das Cytochrom c aus sterischen Gründen unzugänglichen Nische des Xanthinoxidase-Moleküls produziert werden, dann wird die Dismutation im Bildungsbereich durch die höhere lokale Konzentration bevorzugt. In diesem Fall wird auch Wasserstoffperoxid in die Lösung freigesetzt [50]. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Xanthinoxidase zwei verschiedene Arten von Aktivzentren hat, eines das Sauerstoff zum Superoxid, und ein anderes welches Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert. Ein Teil der durch Xanthinoxidase übertragenen Elektronen kann daher direkt oder indirekt in die Bildung von Wasserstoffperoxid einfließen, was über die Cytochrom c-Methode nicht erfassbar ist und somit den beobachteten Wiederfindungskoeffizienten von 0.365 erklärt.

Dieser Wert unterscheidet sich von dem Wert von 0.2, der von Fridovich für Xanthinoxidase bei pH=7.0 gefunden wurde [50]. Der Unterschied zu dem in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Wert von 0.365 ist anscheinend darauf zurückzuführen, daß in [50] 0.1mM EDTA für die Chelatierung von Verunreinigungen der Übergangsmetalle verwendet wurde, die im eingesetzten 0.1M Phosphatpuffer enthalten sind. Die Chelatierung von Eisen mit EDTA hemmt nicht vollständig seine Interaktion mit Superoxidradikalen, wodurch die Konzentration der letzteren sinkt (Kapitel 3.3.2.). Zudem kann EDTA-

komplexiertes Eisen reduziertes Cytochrom c direkt [67] oder indirekt durch Stimulierung der Hydroxylradikalbildung [130] oxidieren und dadurch zu einer Verminderung der Wiederfindungsrate und schließlich des Wiederfindungskoeffizienten führen.

Der Wiederfindungskoeffizient für den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis mit acetyliertem Cytochrom c (60% Acetylierung) unterscheidet sich kaum von dem des nativen Cytochroms (Tabelle 3).

Bei der Anwendung der Cytochrom c- Methode an biologischen Systemen kann ihre quantitative Ausbeute durch Nebenreaktionen beeinflusst werden, wie im Kapitel 4.2.1.1 bereits diskutiert. Für das oben erarbeitete mathematische Modell erfordert das die Einführung einer zusätzlichen Komponenten $-k_3P$ in die Gleichung 13 (Gleichung 16), wenn die unerwünschte Oxidation des Cytochroms vereinfacht als Reaktion erster Ordnung dargestellt wird (Reaktion 41):



Reaktion 41

$$\frac{dP}{dt} = k_2SN - k_3P = v - k_3P$$

Gleichung 16

Wenn die Geschwindigkeit k_3P der Reaktion 41 mit der produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate v vergleichbar ist (Gleichung 16), kommt es zu einer Verminderung der nachgewiesenen Superoxidbildungsrate, da diese aus der Bildungsrate des Reaktionsproduktes $\frac{dP}{dt}$ errechnet wird (Gleichung 8).

Um festzustellen, ob das zu untersuchende System das durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale reduzierte Cytochrom wieder oxidieren kann, was für die quantitative Bestimmung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate zu berücksichtigen wäre, muß eine Kontrollinkubation des zu untersuchenden Systems mit dem zuvor reduzierten Cytochrom c durchgeführt werden.

Die Homogenität der Verteilung der gebildeten $O_2^{\cdot-}$ -Radikale ist bei den quantitativen Aussagen über die produzierten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten ebenfalls zu beachten. Durch eine hohe lokale Konzentration der Superoxidradikale, wie es beispielsweise in dem Phagosom einer phagozytierenden Zelle der Fall ist, wird die Spontandismutation beschleunigt, was zu einem verminderten Anteil der mit Cytochrom c reagierenden $O_2^{\cdot-}$ -Radikale führt. Dieser Effekt wurde im Kapitel 3.7.1.2. beschrieben, wo der Wiederfindungskoeffizient an Zymozan-stimulierten PMN viel niedriger war, als der bei Stimulierung mit PMA, da im ersten Fall die $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung durch Phagozytose mit Phagosombildung begleitet wird. Dies gilt jedoch nicht nur für die Cytochrom c-Methode, sondern auch für die anderen Nachweismethoden.

Die Zugabe von Cytochrom c zum Zweck des $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises kann das untersuchte System oxidativ schädigen und somit die Radikalbildung beeinflussen, wenn auch H_2O_2 in System vorhanden ist. So haben Radi et al. gezeigt [115], daß Cytochrom c in Anwesenheit von H_2O_2 die Lipidperoxidation an Liposomen stimulieren kann. Die Initiierung dieses Prozesses wurde von den Autoren durch die Freisetzung von Häm-Eisen aus dem oxidativ geschädigten Cytochrom sowie teilweise durch das oxidierte und denaturierte Molekül des Cytochroms erklärt. Da H_2O_2 oft als Dismutationsprodukt der Superoxidradikale oder als Produkt der divalenten Reduktion des Sauerstoffs vorhanden ist, sollte beim Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale über die Cytochrom c-Reduktion Katalase zugegeben werden, um H_2O_2 -bedingte Störungen des Nachweissystems auszuschließen.

4.2.2 Nitroblau Tetrazolium (NBT).

4.2.2.1 Qualitative Selektivität.

NBT (Abb. 7) gehört zu den Tetrazoliumsalzen, die als Redoxindikatoren seit langem in der Histologie eingesetzt werden [1,36]. Sein niedriges Redoxpotential $\Delta E^0 = +50\text{mV}$ [1] zeigt, daß es leicht reduzierbar ist. Die Produkte der Reduktion von NBT, Formazane, sind dunkelblau bis schwarz gefärbt.

Neben dem Superoxidradikal sind mehrere elektronenübertragende Enzyme in der Lage, NBT direkt

zu reduzieren. Dies hat auch zu einer weit verbreiteten Anwendung des NBT zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen geführt. Die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase in Gewebe wird z.B. über die Reduktion von NBT bestimmt [1,8].

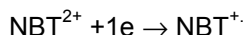
Die Radikalbildung durch stimulierte Zellen wurde ebenfalls über die Reduktion von NBT durch Formazanbildung fixiert und mikroskopisch analysiert, obwohl in diesem Fall nur eine qualitative Aussage möglich ist. So wurde eine deutlich niedrigere Formazan-Bildung durch stimulierte Zellen bei Patienten mit chronischer Granulomatose im Vergleich zu gesunden beschrieben [61,86,117].

Bei physiologisch relevanten pH-Werten liegt NBT als Dikation NBT^{2+} vor. Die Reaktion zwischen Superoxid und NBT^{2+} ist aus thermodynamischer Sicht leicht möglich, da $\Delta E^0 = 330 + 50 = 380 \text{ mV} > 0$ beträgt, so daß die Reaktion spontan ablaufen kann ($\Delta G < 0$, s. Kapitel 4.2.1.1.).

Die Bildung der dunkelblauen Formazane wurde bei der Inkubation des NBT in dem $\text{O}_2^{\cdot-}$ -produzierenden Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) beobachtet (Kapitel 3.4.2.). Die Tatsache, daß die Formazanbildung nur 80%-ig SOD-sensitiv war, weist auf andere Superoxid-unabhängige Möglichkeiten der Farbstoffbildung hin.

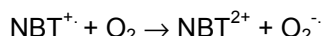
Die Ursache einer SOD-insensitiven NBT-Reduktion besteht vermutlich in einer direkten Elektronenübertragung von Xanthin auf NBT durch die Xanthinoxidase, da die Beteiligung anderer Komponenten des Modellsystems experimentell ausgeschlossen wurde (Kapitel 3.4.2.). Hierfür sprechen auch andere Arbeiten, in welchen die Formazanbildung aus NBT im Xanthin/Xanthinoxidase System unter anaeroben Bedingungen untersucht wurde und SOD ohne Effekt war [18]. Die in der gleichen Arbeit beschriebene aerobe NBT-Reduktion war - in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit beschriebenen Befunden (Abb. 9) - nur bis zu 80% SOD-hemmbar. Es kann somit geschlossen werden, daß ein Anteil der NBT-Reduktion von nahezu 20% durch eine direkte Xanthinoxidase-vermittelte Elektronenübertragung auf NBT abläuft und daher durch SOD nicht hemmbar ist.

Ist die Formazanbildung SOD-sensitiv, liefert dies jedoch noch keinen eindeutigen Beweis der im System stattfindenden Superoxidbildung. So wurde beschrieben, daß NBT selbst die Bildung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen vermitteln kann. Liochev und Fridovich [73] haben gezeigt, daß Nitroblau Tetrazolium (NBT^{2+}) durch das Enzym Glukoseoxidase univalent reduziert wird:



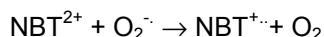
Reaktion 42

Das dabei gebildete Tetrazoliny Radikal ($\text{NBT}^{+ \cdot}$) autooxidiert, wobei das Elektron auf ein Sauerstoffmolekül übertragen wird:



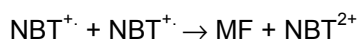
Reaktion 43

Hierdurch kommt es zur Bildung von ursprünglich nicht vorhandenen Superoxidradikalen. Die auf diese Weise entstandenen Superoxidradikale können weiter Nitroblau Tetrazolium zum Tetrazoliny Radikal reduzieren (Reaktion 44).



Reaktion 44

Das nachweisbare farbige Monoformazan wird bei der Disproportionierung von $\text{NBT}^{+ \cdot}$ gebildet:



Reaktion 45

Wird Superoxid aus dieser Reaktionssequenz mittels SOD entfernt, dann ist ebenfalls eine Verminderung der Formazanbildung zu erwarten, obwohl das System nur eine direkte Elektronenübertragung auf NBT vermittelt und keine $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale ohne Zusatz von NBT produziert.

In der Arbeit von Bielski et al. [21] konnte hingegen keine wesentliche Autoxidation des Tetrazoliny Radikals mit der Bildung von Superoxidradikalen nachgewiesen werden. Dieser Widerspruch läßt sich

lösen, wenn die Reaktionsbedingungen verglichen werden. Die Experimente mit Glukoseoxidase wurden bei pH=9.5 durchgeführt, während die gleiche Reaktion in [21] bei pH=7.0 untersucht wurde. Da der pK-Wert für NBT^{•-}-Radikale 7.47 beträgt [21], ist eine Autoxidation eher im alkalischen Milieu zu erwarten. Bei physiologischem pH-Wert liegt die Hälfte der Tetrazolinyln-Radikale deprotoniert vor, wodurch die Möglichkeit der Superoxidbildung begünstigt wird.

Da Superoxidradikale auch als Zwischenprodukte der O₂^{•-}-unabhängigen NBT-Reduktion entstehen können, kann die SOD-sensitive Formazanbildung nicht ausschließlich als Folge der Superoxidbildung in dem zu untersuchenden System angesehen werden. Hieraus ergibt sich, daß die NBT-Methode nicht ausreichend selektiv für einen eindeutigen Nachweis der O₂^{•-}-Radikale ist.

4.2.2.2 *Quantitative Ausbeute.*

Von allen im Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase angewandten Farbstoffen wurde mit NBT die größte Wiederfindungsrate erhalten. Die Abhängigkeit der Bildungsrate des Reaktionsproduktes von der Superoxidbildungsrate erwies sich als linear und der Wiederfindungskoeffizient betrug 1.009. Da nur 80% der Formazan-Bildung SOD-sensitiv war (Abb. 9), muß dieser von 1.009 auf 1.009x0.80 = 0.807 korrigiert werden.

Die Linearität der Abhängigkeit der Formazanbildungsrate von der Superoxidbildungsrate weist darauf hin, daß in der Sequenz der Reaktionen, die zur Formazanbildung führen, die Reaktion zwischen NBT und Superoxid der limitierende Schritt ist. Wäre dies anders, so hätte man eine Sättigung bei höheren O₂^{•-}-Bildungsraten finden müssen, welche durch die nachfolgende langsamere Reaktionen zu erklären wäre.

Abgesehen von der mangelnden Selektivität dieser Methode, treten auch Probleme bei der genaueren quantitativen Einschätzung der Superoxidbildungsrate auf. Die Ursache dafür liegt in verschiedenen parallel entstehenden Reduktionsstufen des NBT - Monoformazan und Diformazan. Zwei Elektronen sind für die Reduktion des NBT zum Monoformazan notwendig, während die Bildung des Diformazans die Reduktion mit 4 Elektronen erfordert (Abb. 7). Die in dieser Arbeit durchgeführte chromatographische Analyse der Reaktionsprodukte hat ergeben, daß Monoformazan und Diformazan gleichzeitig bei der Reduktion von NBT im Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystem gebildet werden (Kapitel 3.4.2.). In den anderen biologischen Systemen werden ebenfalls beide Reduktionsprodukte gebildet, so z.B. bei der Anwendung der NBT-Methode zur Untersuchung der Aktivität der Succinat Dehydrogenase im Gewebe [8].

Die Absorptionsspektren des Mono- und Diformazans überlappen sich [37]. Für die summarische optische Dichte A(λ) zweier Farbstoffe, die gleichzeitig in den Konzentrationen c₁ bzw. c₂ in der Lösung vorhanden sind und die Extinktionskoeffizienten ε₁(λ) bzw. ε₂(λ) aufweisen, gilt:

$$A(\lambda) = \varepsilon_1(\lambda) c_1 + \varepsilon_2(\lambda) c_2,$$

Gleichung 17

wobei die Konzentrationen c₁ und c₂ unbekannt sind. Die Messung der optischen Dichte A(λ) bei einer Wellenlänge λ gibt somit keine Information über den Anteil des jeweiligen Farbstoffes, was schließlich eine quantitative Bestimmung von auf NBT übertragenen Elektronen unmöglich macht.

Darüber hinaus hat die schlechte Wasserlöslichkeit der Formazane zur Folge, daß diese in wässrigen Reaktionssystemen ausfallen und dadurch eine adäquate Messung der optischen Dichte erschwert ist. Um die Ausfällung des schlecht wasserlöslichen Formazans zu verhindern, werden häufig Gelatine oder Detergentien (Triton) der Reaktionsmischung zugesetzt [1]. Ein anderer Zugang zu dem Problem der schlechten Wasserlöslichkeit der Formazane liegt in der Extraktion der Farbstoffe mit einem geeignetem Lösungsmittel (z.B. Dioxan) [118]. In diesem Fall sind jedoch keine kontinuierlichen Messungen der Radikalbildungsrate einer Probe möglich. Für die Bestimmung einer Kinetik sind dann Extraktionen aus mehreren parallel laufenden Proben erforderlich. Das Problem der genauen Quantifizierung einzelner Reaktionsprodukte wird auf diese Weise jedoch nicht gelöst.

Die unlöslichen Formazane können auch in Wechselwirkung mit dem zu untersuchenden System treten und dieses beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist die Agglutination von stimulierten PMN in Anwesenheit von Nitroblau Tetrazolium, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde (Kapitel 3.7.1.2.1). Ein ähnlicher Effekt der toxischen Wirkung von NBT ist an unreifen Neutrophilen des

Knochenmarks beobachtet worden [128]. Die Schädigung von Zellen in Anwesenheit von NBT wurde hier durch Stimulierung mit Endotoxin sowie mit Latex-Partikeln wesentlich verstärkt, was auf die besondere Toxizität der gebildeten Formazane hinweist.

Somit können qualitative und quantitative Aspekte des photometrischen $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises mit dem Farbstoff NBT wie folgt zusammengefaßt werden. Die Bildung der Formazane in dem zu untersuchenden System reflektiert nicht ausschließlich die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung, sondern kann auch durch andere, biologisch relevante Reaktionen erfolgen (enzymatische Reduktion). Die SOD-Hemmbarkeit der Formazan-Bildung kann nicht als ausreichender Beweis für die Existenz von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen betrachtet werden, da diese unter den biologisch relevanten Bedingungen als Zwischenprodukte in der Kettenreaktion der Formazanbildung entstehen können.

Die überlappenden Spektren der gleichzeitig gebildeten Di- und Monoformazane erschweren zusätzlich den quantitativen Nachweis; die schlechte Wasserlöslichkeit der Reaktionsprodukte kann unerwünschte toxische Wechselwirkungen mit dem zu untersuchenden biologischen System verursachen.

4.2.3 Epinephrin (Adrenalin).

4.2.3.1 Qualitative Selektivität.

Epinephrin (Adrenalin) (Abb. 10), das zu den Catecholaminen gehört, tritt im Organismus als Hormon und Neurotransmitter mit vielseitigen Funktionen auf. Es hat eine stimulierende Wirkung auf das Herz, verengt Blutgefäße der Haut, der Schleimhäute und der Baueingeweide, erweitert die Gefäße der Skelettmuskeln und der Leber, verringert die Darmperistaltik und erweitert die Bronchien. Ursprünglich wurde Epinephrin zur Bestimmung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikalfängereigenschaften der SOD verwendet [92]. Da die Autoxidation des Epinephrins zum Adrenochrom im alkalischen Medium durch Superoxidradikale vermittelt wird, hemmt SOD konzentrationsabhängig die Adrenochrombildung. Seitdem eine SOD-sensitive Adrenochrombildung aus Epinephrin auch bei physiologischem pH-Wert im Xanthin/Xanthinoxidase System beschrieben wurde [147], wurde dieses Indikatorsystem auch zum Nachweis der Superoxidbildung an anderen biologischen Systemen, z.B. an Mitochondrien verwendet [38,101,104]. Zum Nachweis der Superoxidbildung an isolierten Organen, z.B. bei Ischämie/Reperfusions-Schäden, ist Epinephrin wegen seiner biogenen Wirkung nicht geeignet.

Die Kooxidation des Epinephrins im Xanthin/Xanthinoxidase System führt zur Bildung von Adrenochrom, was über die Zunahme der optischen Dichte bei 480nm registriert werden kann.

Allerdings sind nicht nur $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in der Lage, die Oxidation von Epinephrin zum Adrenochrom in Gang zu setzen. Im alkalischen pH-Bereich wird Adrenochrom auch durch spontane Autoxidation des Epinephrins gebildet, wobei Superoxidradikale als Zwischenprodukte auftreten (Abb. 55). Die Autoxidation des Adrenalin-Anions, welche zur Bildung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale führt, wird hier als erster Schritt der Oxidationssequenz vermutet [26], da die Superoxidbildung nur bei pH-Werten über 8.5 beobachtet wurde, was mit dem pK_a -Wert für Epinephrin übereinstimmt.

Hydroxylradikale können Epinephrin ebenfalls effizient oxidieren, wobei auch Adrenochrom als Reaktionsprodukt gebildet wird [27]. Übergangsmetalle beschleunigen die Autoxidation des Epinephrins bei neutralen pH-Werten, wobei wiederum Adrenochrom als Endprodukt auftritt [92]. Da die durch Übergangsmetalle katalysierte Adrenochrombildung bei neutralen pH-Werten SOD-insensitiv ist [92], kann sie von der $O_2^{\cdot-}$ -vermittelten Reaktion unterschieden werden. Im alkalischen Bereich ist jedoch die Fe-katalysierte Oxidation des Epinephrins zum Teil mit SOD hemmbar, was auf eine intermediäre Bildung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in jener Reaktionssequenz hinweist, die durch andere Spezies als $O_2^{\cdot-}$ -Radikale (hier durch Übergangsmetalle) in Gang gesetzt wird.

Ein zusätzliches Problem der qualitativen Selektivität der Epinephrin-Methode liegt darin, daß Adrenochrom, auch wenn es durch einen $O_2^{\cdot-}$ -unabhängigen Prozess in einem System gebildet worden ist, in Anwesenheit von Reduktionäquivalenten direkt zur Superoxidbildung beitragen kann [22,111]. Es wurde gezeigt [22], daß Adrenochrom enzymatisch (über mitochondriale NADPH-Dehydrogenase) oder nicht-enzymatisch (durch Ascorbinsäure) zum Leukoadrenochrom reduziert werden kann, das schnell autooxidiert. Hierbei werden $O_2^{\cdot-}$ -Radikale und Adrenochrom gebildet, wobei letzteres erneut reduziert werden kann. Die durch Redoxzyklierung gebildeten Superoxidradikale könnten dann einen $O_2^{\cdot-}$ -abhängigen Mechanismus der Oxidation von Epinephrin zum Adrenochrom in

die Wege leiten. Auf diese Weise kann das gebildete Adrenochrom die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung auch in einem System vermitteln, in dem selbst ohne das Nachweissystem keine $O_2^{\cdot-}$ -Radikale gebildet werden.

Somit kann nur eine 100%ig SOD-sensitive Adrenochrombildung bei pH-Werten unter 8 als qualitativer Beweis der im System stattfindenden Superoxidbildung angesehen werden.

In dem Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystem war die Bildung von Adrenochrom zu 100% mit SOD hemmbar (Abb. 13), was eine systembedingte Bildung der Superoxidradikale anzeigt. Die $O_2^{\cdot-}$ -unabhängigen Reaktionen leisten hier keinen wesentlichen Beitrag zur Adrenochrombildung, da die Komplexbildung von Übergangsmetallen mit DTPA die Realisierung ihrer Redoxaktivität für eine direkte sowie für eine OH^{\cdot} -vermittelte Oxidation verhindert.

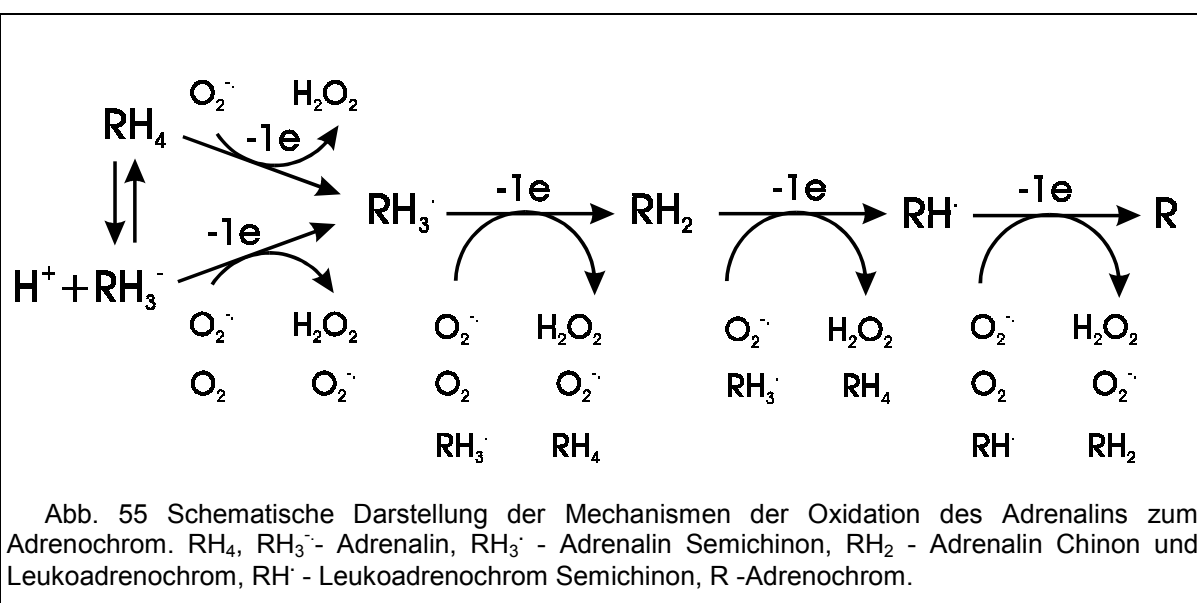
4.2.3.2 Quantitative Ausbeute.

Die im Xanthin/Xanthinoxidase Modellsystem angewandte Epinephrin-Methode ergab einen Wiederfindungskoeffizienten von 0.57 (Abb. 11), der sich von den Koeffizienten, die über andere photometrische Methoden erhalten wurden, unterscheidet. Der Wert des Koeffizienten ist größer als mittels Cytochrom c-Methode, aber geringer als mittels NBT-Methode ermittelt.

Die Geschwindigkeitskonstante der limitierenden $O_2^{\cdot-}$ -vermittelten Oxidation des Epinephrins zum Epinephrin-Semichinon ist mit $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ genügend hoch, um die Spontandismutation vernachlässigen zu können, wenn die Konzentration des Epinephrins 1mM beträgt ($\alpha \ll 1$, Gleichung 9).

Daß in den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate von der eingesetzten Konzentration des Epinephrins unabhängig war (Abb. 12), weist darauf hin, daß der notwendige Überschuß der Nachweissubstanz (Epinephrin) vorhanden war.

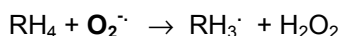
Der Kettenreaktionsmechanismus der Superoxid-vermittelten Oxidation von Epinephrin erschwert einen quantitativen Nachweis der Superoxidbildung (Abb. 55). Die Oxidation zum Adrenochrom besteht in der Abgabe von insgesamt 4 Elektronen, wobei als Zwischenprodukte radikalische Semichinone (Adrenalin Semichinon RH_3^{\cdot} und Leukoadrenochrom Semichinon RH^{\cdot}) auftreten [63]. Durch Autoxidation können diese zu einer zusätzlichen $O_2^{\cdot-}$ -Bildung beitragen (Reaktion 47, Reaktion 49). Die Autoxidation dieser vom Adrenalin abgeleiteten Semichinone ist pH-Wert-abhängig und steigt im alkalischen pH-Bereich an [92]. Da die pK_a -Werte der Semichinone um 3-4 pH-Einheiten niedriger sind, als die der entsprechenden Catecholamine, ist eine effektive Autoxidation dieser Zwischenprodukte bei physiologischem pH-Wert zu erwarten. Hierdurch kann auch die Tatsache erklärt werden, daß die Anzahl gebildeter Adrenochrom-Moleküle pro nachgewiesenem Superoxidmolekül mit steigendem pH-Wert im Xanthin/Xanthinoxidase System zunimmt [92], was auf



die Beteiligung der im Nachweissystem zusätzlich gebildeten $O_2^{\cdot-}$ -Radikale hinweist.

Als Elektronenakzeptor bei der Adrenalinoxidation kann u.a. H_2O_2 auftreten (Abb. 55), ebenso kann dieses das gebildete Adrenochrom weiter oxidieren [26]. Durch Anwesenheit der Katalase im Modellsystem wurden jedoch diese unerwünschten Reaktionen unterdrückt.

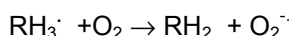
Wie aus dem Schema in Abb. 55 ersichtlich, hängt die Anzahl der gebildeten Adrenochrom-Moleküle pro reagierendem Superoxidmolekül von dem Reaktionsmechanismus ab. Mindestens ein exogen gebildetes $O_2^{\cdot-}$ -Molekül ist nötig, um die Reaktionskette der Adrenochrombildung bei physiologischem pH-Wert in Gang zu setzen. Dieses initiiert die Abstraktion eines Elektrons von einem Adrenalin-Molekül, eine Reaktion, die bei neutralem pH-Wert in Abwesenheit von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen nur sehr langsam abläuft:



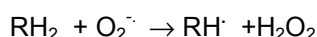
Reaktion 46

(die exogen zugeführten $O_2^{\cdot-}$ -Moleküle sind fett markiert).

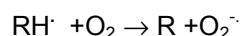
Weitere Oxidationsschritte können über die Autoxidation der intermediär gebildeten Semichinone und über die nachfolgenden Reaktionen zwischen den intermediären Produkten erfolgen (Reaktion 47-49):



Reaktion 47



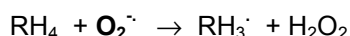
Reaktion 48



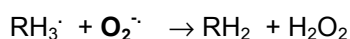
Reaktion 49

In dem oben angeführten Fall hätte die $O_2^{\cdot-}$ /Adrenochrom Stöchiometrie einen minimalen Wert von 1:1, da für die Bildung eines Adrenochrom-Moleküls nur ein $O_2^{\cdot-}$ -Molekül zugeführt wird (Reaktion 46).

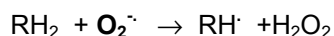
Die maximale theoretische Anzahl der eingeführten Superoxidmoleküle pro gebildetem Adrenochrom-Molekül ist 6. Diese Stöchiometrie kommt zustande, wenn die Oxidationsschritte bis hin zum Leukoadrenochrom-Semichinon ausschließlich durch exogen produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Moleküle in Gang gesetzt werden (Reaktion 50 - Reaktion 52) und der letzte Oxidationsschritt durch eine Disproportionierung von Leukoadrenochrom-Semichinone geschieht (Reaktion 53):



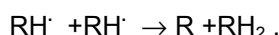
Reaktion 50



Reaktion 51



Reaktion 52



Reaktion 53

Der Wiederfindungskoeffizient von 0.57 wurde unter der Annahme einer 4:1 $O_2^{\cdot-}$:Adrenochrom Stöchiometrie errechnet. Die nachgewiesene $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate wurde hierbei durch Multiplikation mit 4 aus der Adrenochrombildung nach der Gleichung 10 bestimmt. Daher ist die Adrenochrombildungsrate mit dem O_2 -Umsatz durch einen Koeffizienten von $0.57:4=0.143$ verbunden.

Wird der Wiederfindungskoeffizient von 0.365, der sich beim Nachweis mit Cytochrom c ergibt, als tatsächlicher Anteil des zum $O_2^{\cdot-}$ -reduzierten Sauerstoffs betrachtet, dann kann die Anzahl der benötigten exogenen $O_2^{\cdot-}$ -Moleküle für die Bildung eines Adrenochrom-Moleküls als $0.365:0.143 \approx 2.55$ berechnet werden. Diese errechnete Stöchiometrie zeigt, daß keine der oben diskutierten Reaktionsmechanismen (weder 1:1 noch 6:1 Stöchiometrie) das Epinephrin/Adrenochrom-System exakt beschreiben kann. Dies erklärt auch, warum trotz gleicher $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate im X/XOD System die Adrenochrombildung 2.55mal langsamer verläuft, als die Bildung von reduziertem Cytochrom c.

Dieser Befund unterscheidet sich von früheren Untersuchungen von Cadenas et al. [38], in denen die Adrenochrombildungsrate und die Bildungsrate von reduziertem Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase System als gleich gefunden wurden. Diese Differenz ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß Cadenas et al. in ihren Experimenten die Verunreinigungen mit Übergangsmetallen nicht berücksichtigt haben. Obwohl der in [38] eingesetzte 50mM Trispuffer ebenso wie die Xanthinoxidase Übergangsmetalle als Verunreinigungen enthalten, wurden keine Metallchelatoren und keine Katalase zugegeben. Das kann die Bildungsrate des reduzierten Cytochrom c, wie vorher diskutiert, vermindern, da die Konzentration von Superoxidradikalen wegen der Reaktionen mit Übergangsmetallen sinkt (Kapitel 3.3.2.). Zudem können Hydroxylradikale gebildet werden, die reduziertes Cytochrom c oxidieren und dadurch die über Cytochrom c -Reduktion abgeleitete $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate niedriger erscheinen lassen, als sie tatsächlich ist. Die Adrenochrombildung wird hingegen durch Übergangsmetalle sowie durch Hydroxylradikale beschleunigt, so daß sich im Endergebnis eine 1:1 Adrenochrom: Cytochrom c Stöchiometrie ergeben kann, die jedoch, wie dargestellt, nicht nur durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale bestimmt wird.

Der Nachweis der Superoxidbildungsrate mit der Epinephrin-Methode an stimulierten Zellen ergab eine große Streuung der Meßwerte (Abb. 39), welche auf den niedrigen Extinktionskoeffizienten des Adrenochroms und auf die Schwankungen der Lichtstreuung durch suspendierte Zellen zurückzuführen ist. Die anderen Oxidantien wie Hypochlorit oder Peroxinitrit, die neben dem Superoxid durch stimulierte Zellen produziert werden, können in verschiedenem Ausmaß ebenfalls zur Oxidation des Epinephrins führen, was weiterhin die exakte Bestimmung der Superoxidbildungsrate erschwert. Die Zugabe von SOD hemmt auch die Bildung des Peroxinitrites, das ja aus NO und $O_2^{\cdot-}$ gebildet wird (Reaktion 32). Daher bleibt die Adrenochrombildung auch dann SOD-sensitiv, wenn $O_2^{\cdot-}$ -Radikale gar nicht direkt für die Kooxidation des Epinephrins zum Adrenochrom verantwortlich waren. Somit ist zu berücksichtigen, daß in den Systemen, in welchen Superoxid in die Bildung anderer oxidierender Spezies involviert ist, die Adrenochrombildung SOD-sensitiv bleibt, auch wenn der eigentliche Oxidant des Epinephrins nicht identisch mit dem gesuchten Superoxidradikal ist.

PMN können Epinephrin nicht nur zum Adrenochrom umsetzen. Die in diesem System vorhandenen Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Carboxy-O-Methyltransferase (COMT) können bis zu 20% des zugesetzten Epinephrins metabolisieren [81], wobei als Hauptmetabolit Vanillinmandelsäure (VMS) entsteht, deren Absorptionsspektrum jedoch nicht mit dem des Adrenochroms bei 480nm interferiert. Das ist auch von Vorteil beim Nachweis der Superoxidbildung an Mitochondrien, wo Epinephrin zwar durch MAO der mitochondrialen Außenmembran [143] umgesetzt werden kann, die entstehenden Metabolite jedoch nicht zur optischen Dichte bei 480nm beitragen. Dadurch wird der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis mit der Epinephrin-Methode an Mitochondrien ermöglicht (Abb. 45).

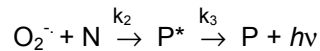
Die qualitative Beteiligung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale an der Adrenochrombildung wird an Mitochondrien aus der hemmenden Wirkung des Enzyms SOD abgeleitet. Eine Redoxzyklisierung des gebildeten Adrenochroms findet unter diesen experimentellen Bedingungen nicht statt [22]. Die quantitativen Aussagen über die Superoxidbildungsrate an Mitochondrien sind jedoch nur mit Vorbehalt möglich, da nicht feststeht, wie die tatsächliche Reaktionsstöchiometrie ist und ob die anderen $O_2^{\cdot-}$ -abhängigen oxidativ wirkenden Spezies zur Adrenochrombildung beitragen.

4.3 Chemilumineszenz - Methoden.

Chemilumineszenz (CL) als Nachweismethode der Radikalbildung wird häufig zur Untersuchung biologischer Objekte eingesetzt. Als eine nicht-invasive und hochempfindliche Methode hat die Chemilumineszenz eine weite Verbreitung in der Erforschung radikalischer Prozesse gefunden, obwohl die Ergebnisse nicht immer eine eindeutige Interpretation zulassen.

Um einen Nachweis der Superoxid-Bildung über Chemilumineszenz zu beschreiben, muß das kinetische Modell (s. Kapitel 4.2) modifiziert werden. Die Superoxidbildung und die Dismutation beschreibenden Reaktionen 37 bzw. 38 bleiben unverändert, während die anderen Reaktionen für die Chemilumineszenz umgeschrieben werden müssen. Bei der Reaktion einer Nachweissubstanz N mit

Superoxid entsteht ein angeregtes Produkt P* (Reaktion 54):



Reaktion 54

Dieses kehrt in den Grundzustand entweder mit dem Ausstrahlen eines Lichtquanten (k_3) oder über einen strahlungslosen Weg (k_4 , Reaktion 55) zurück:



Reaktion 55

Erfasst werden hier die Photonen ($h\nu$), wobei für die Intensität der Chemilumineszenz I gilt:

$$I = k_3 \text{P}^*$$

Gleichung 18

Das System differentieller Gleichungen muß ebenfalls modifiziert werden:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = v - k_1 S^2 - k_2 SN \\ \frac{dP^*}{dt} = k_2 SN - (k_3 + k_4) P^* \end{cases}$$

Gleichung 19

In dem stationären Zustand beträgt die Konzentration P^*_{ss} des angeregten Reaktionproduktes

$$\text{P}^*_{ss} = \frac{k_2 S_{ss} N}{(k_3 + k_4)}$$

Gleichung 20

wo S_{ss} - die Konzentration der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale im stationären Zustand ist. Ist die Dismutation vernachlässigbar gering, dann gilt:

$$S_{ss} \approx \frac{v}{k_2 N}$$

Gleichung 21

Aus Gleichung 20 und Gleichung 21 ergibt sich die Chemilumineszenz-Intensität im stationären Zustand I_{ss} als

$$I_{ss} = k_3 \text{P}^*_{ss} \approx k_3 \cdot \frac{k_2 N}{(k_3 + k_4)} \cdot \frac{v}{k_2 N} = \frac{v}{1 + k_4/k_3}$$

Gleichung 22

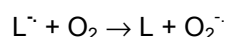
Aus Gleichung 22 ergibt sich, daß die Chemilumineszenz-Intensität I_{ss} der Superoxidbildungsrate v direkt proportional ist, und zwar mit einem Koeffizienten, welcher von der Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen (k_4) und der emissiven (k_3) Desaktivierung abhängig ist. Die Intensität der Chemilumineszenz im stationären Zustand I_{ss} muß unabhängig von der Konzentration der Nachweissubstanz sein, wenn der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Nachweis mit dem oben ausgeführten mathematischen Modell beschrieben werden soll.

4.3.1 Luminol.

Luminol wird seit langem als lumineszente Probe zum Nachweis der Radikalbildung an stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen eingesetzt [5]. Eine andere verbreitete Applikation der Luminol-Chemilumineszenz ist die Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Substanzen. Das Meßprinzip beruht darauf, daß die Radikale enzymatisch [13,119], thermolytisch [75] oder photochemisch [110,144] in Anwesenheit des Luminols produziert werden, wobei die Chemilumineszenz registriert wird. Bei der Zugabe von Radikalfängern wird die Chemilumineszenz konzentrationsabhängig „gequencht“, was als Maß für die antioxidative Wirkung angesehen wird.

Der chemisch-physikalische Mechanismus, welcher der Lichtabstrahlung zu Grunde liegt, ist kompliziert. Nach neueren Erkenntnissen ist die Oxidation des Luminols (LH^-) zum Luminol-Radikal (LH^\cdot) der erste Schritt in dem zur Chemilumineszenz führenden Prozeß [88] (s. Abb. 56). Manche Enzyme (Meerrettich Peroxidase, Laktoperoxidase) [95,138], Radikale (OH^\cdot) [88] sowie komplexierte Übergangsmetalle [129] sind in der Lage, Luminol zum Luminolradikal zu oxidieren. Da das Superoxidradikal weder ein starker Oxidant noch ein starker Reduktant ist, ist eine effektive Oxidation des Luminols durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale nicht zu erwarten [87]. Tatsächlich ist die Quantenausbeute der lumineszenten Reaktion zwischen Luminol und Superoxid mit $4 \cdot 10^{-8}$ Photonen pro $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Molekül zu gering, um die Superoxidradikale als effiziente Oxidantien des Luminols ansehen zu können [87].

Das im ersten Reaktionsschritt gebildete Luminol-Radikal LH^\cdot kann in anionischer Form ($\text{L}^{\cdot-}$) Sauerstoff zum Superoxid reduzieren (Abb. 56). Der pK_a -Wert der Luminolradikale (LH^\cdot) beträgt 7.7 [88], so daß bei physiologischen pH-Werten ca.50% als Anionen vorliegen und diese Sauerstoff zum Superoxid reduzieren können (Reaktion 56):



Reaktion 56

Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 56 wird mit $5.5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben [88], somit kann das $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikal als ein mögliches Zwischenprodukt bei der Oxidation des Luminols auftreten, auch wenn diese durch andere Oxidantien als Superoxid in Gang gesetzt wurde.

Unabhängig von der Protonierung, wird beim Zerfall des Luminolhydroperoxides (L^\cdotOOH oder LHOOH) das Aminophthalat AP gebildet (Abb. 56). Die Chemilumineszenz entsteht jedoch nur, wenn das Monoanion L^\cdotOOH zum Aminophthalat zerfällt (Abb. 56). Der beobachtete pK -Wert für das Chemilumineszenzsystem wird mit 9.2 angegeben und ist vom Mechanismus der Luminoloxidation unabhängig [88].

Wie die Experimente im Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase gezeigt haben, ist die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz nicht nur von der Superoxidbildungsrate abhängig. So wurde eine konstante $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate durch eine glockenförmige Chemilumineszenz-Kinetik begleitet (Abb. 13A), was den an eine Nachweismethode gestellten Erwartungen widerspricht. Wie aus Gleichung 22 folgt, muß die Intensität der Chemilumineszenz der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate proportional sein. Qualitativ bedeutet das, daß eine konstante $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate durch eine Chemilumineszenz konstanter Intensität begleitet werden sollte, was jedoch nicht der Fall war. Die hier beschriebenen Untersuchungen ergaben, daß die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz auch gegenüber Spurenkonzentrationen von ungebundenen Übergangsmetallen empfindlich ist (Kapitel 3.5.1.). Trotzdem war die Chemilumineszenz vollkommen SOD-hemmbar, vermutlich aus dem Grund, daß Superoxidradikale auch als Zwischenprodukte bei der Oxidation von Luminol selbst auftreten können (Abb. 56).

Die nur teilweise SOD-Hemmbarkeit der Chemilumineszenz an stimulierten Zellen (Abb. 42) weist darauf hin, daß die Chemilumineszenz des Luminols auch über einen $\text{O}_2^{\cdot-}$ -unabhängigen Mechanismus in diesem System ausgelöst werden kann. Hydroxylradikale konnten an der Luminol-Chemilumineszenz in diesem System kaum beteiligt sein, da die ESR-Experimente unter identischen Bedingungen keine Bildung von Hydroxyl-Addukten angezeigt haben (Abb. 45). Wasserstoffperoxid, das als Dismutationsprodukt der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale gebildet wird, hat hingegen zur Chemilumineszenz des Luminols an stimuliertem PMN beigetragen, wie durch die hemmende Wirkung der Katalase gezeigt wurde (Abb. 44). Die mangelnde Selektivität des Luminols im Bezug auf den Nachweis der Superoxidradikale wird verständlich, wenn man den Mechanismus der Chemilumineszenzentwicklung mit Blick auf die anderen durch die Zellen produzierten aktiven Sauerstoffspezies analysiert.

Bei der Aktivierung der phagozytierenden Zellen werden neben den $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen noch weitere oxidativ wirkende Substanzen wie z.B. Hypochlorit und Peroxynitrit gebildet. Diese können die für die

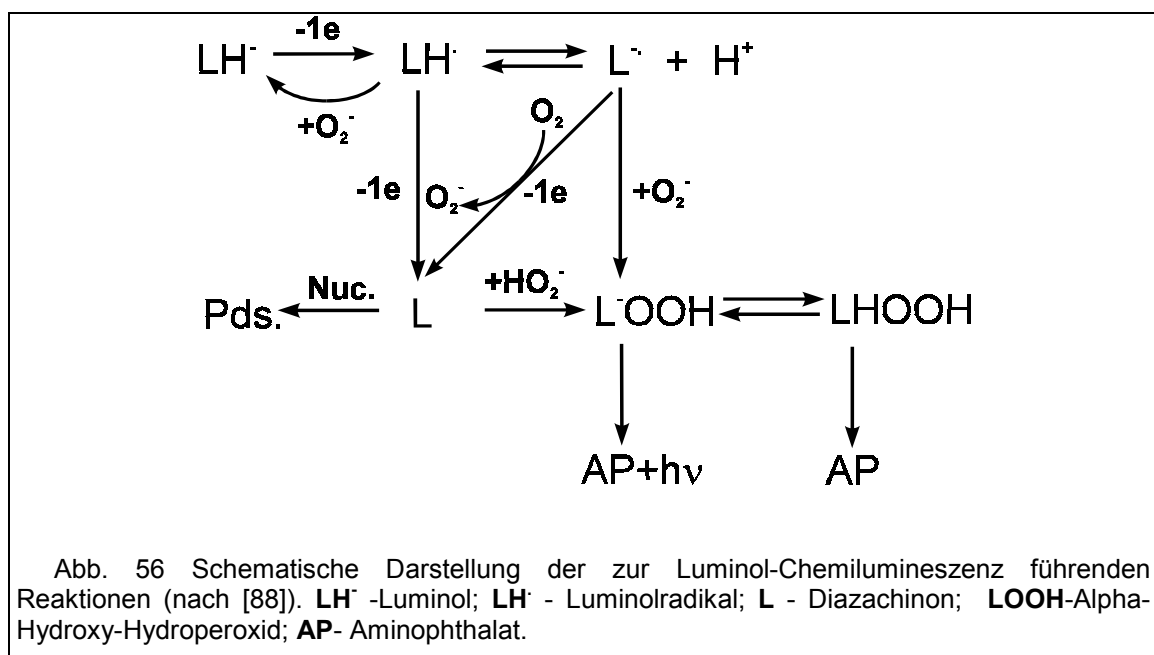
Chemilumineszenz erforderlichen Schritte in Gang setzen, nämlich die Oxidation des Luminols LH^- zum Luminolradikal LH^\cdot und weiter zum Diazachinon L , wobei letzteres in einer Reaktion mit Wasserstoffperoxid zur Bildung des leuchtenden Aminophthalates führen kann (Abb. 56).

Die Chemilumineszenz des Luminols in Anwesenheit von Hypochlorit und Wasserstoffperoxid ist für *in vitro*-Systeme beschrieben worden [9], daher ist die Beteiligung des Hypochlorites auch an der Entwicklung der Chemilumineszenz des Luminols in biologischen Objekten nicht ausgeschlossen. Ein indirekter Beweis hierfür besteht darin, daß die Luminol-Chemilumineszenz an stimulierten Granulozyten von Patienten mit einem genetisch bedingten Mangel an Myeloperoxidase (Reaktion 27) im Vergleich zu Gesunden eine viel niedrigere Intensität aufweist [52].

Peroxynitrit ONOO^- wird aus Superoxid und Stickstoffmonoxid gebildet (Reaktion 32) [126]. Da die NO-Synthase und NADPH-Oxidase eine gemeinsame Aktivierungsstufe über die Proteinkinase C bei der PMA-Stimulierung von Zellen aufweisen [39], ist die Bildung des Peroxynitrites durch PMA-stimulierten Zellen zu erwarten. Peroxynitrit ist in der Lage, Luminol zum Luminolradikal zu oxidieren [114] und hierdurch eine zur Chemilumineszenz führende Reaktionssequenz zu starten. Die Beteiligung des Peroxynitrites an der Luminol-Chemilumineszenz von stimulierten PMN wurde über die hemmende Wirkung von Inhibitoren der zellulären NO-Synthase auf die Intensität der Chemilumineszenz abgeleitet [41]. Hydroxylradikale, deren Bildung aus der protonierten Form des Peroxynitrites ONOOH ($\text{pK}=6.8$ [113]) diskutiert wird [112], könnten ebenfalls zur Oxidation des Luminols über den emissiven Weg beitragen.

Die unerwünschten Nebenreaktionen, welche die Chemilumineszenz des Luminols beeinflussen können, sind jedoch nicht nur auf der Stufe der Luminolradikalbildung möglich. Die entstehenden Zwischenprodukte der von Lumineszenz begleiteten Oxidation des Luminols wie Luminolradikal und Diazachinon könnten durch Nebenreaktionen aus dem System entfernt werden. Dies würde eine Verringerung der Chemilumineszenz-Intensität mit sich bringen, ohne daß es einen Bezug zur $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung gäbe. So wird eine Hemmung der Luminol-Chemilumineszenz in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid durch die Nebenreaktionen der Oxidationszwischenprodukte erklärt [40]. In der vorliegenden Untersuchung ist eine Hemmung der Chemilumineszenz des Luminols bei der Zugabe von Harnsäure registriert worden, die jedoch keine Hemmung der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung widerspiegelte (Abb. 19, Kapitel 3.5.1).

Somit ist die Konzentration der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale weitgehend nicht der einzige und entscheidende Faktor, welcher die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz bestimmt. Umgekehrt kann diese nicht als Maß der Superoxidbildung dienen. Da bereits in einem relativ einfachen Modellsystem wie Xanthin/Xanthinoxidase sich deutliche störende Wechselwirkungen ergeben, ist ein selektiver $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Nachweis über die Luminol-Chemilumineszenz an komplexeren biologischen Systemen nicht möglich.



Die Anwendung von SOD kann hier das Problem der Selektivität nicht lösen, da $O_2^{\cdot-}$ -Radikale als Zwischenprodukte der Oxidation von Luminol auftreten können.

4.3.2 Lucigenin.

Im Gegensatz zum Luminol wird Lucigenin als eine $O_2^{\cdot-}$ -spezifische lumineszierende Probe angesehen. Am häufigsten wird diese Methode zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an stimulierten Zellen verwendet [5,7], obwohl Lucigenin auch zum Nachweis der Radikalbildung an Mitochondrien [116] sowie an isolierten Enzymen [70,133,139] zunehmend häufige Anwendung findet.

Mögliche Reaktionswege des Lucigenins, die zur Chemilumineszenz führen, sind in Abb. 57 dargestellt. Die Reaktion zwischen dem Lucigenin-Kationradikal $LC^{\cdot+}$ und dem Superoxidradikal führt zur Bildung von Dioxetan $LC-O_2$. Dieses ist instabil und zerfällt in zwei Moleküle N-Methylacridon (MA), wobei eines aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand übergeht und dabei die als Chemilumineszenz beobachtete Strahlung bedingt (Abb. 57). Die primäre Reduktion des Lucigenins LC^{2+} zum Lucigenin-Kationradikal $LC^{\cdot+}$ kann durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale sowie durch manche Enzyme erfolgen. Obwohl das Wasserstoffperoxid als divalent reduzierter Sauerstoff die stöchiometrischen Anforderungen der Chemilumineszenz-Reaktion erfüllt, wird Lucigenin nur bei alkalischen pH-Werten durch H_2O_2 reduziert. Das divalent reduzierte Lucigenin kann auch mit Singulett-Sauerstoff reagieren (Abb. 57).

Im Unterschied zum Luminol, stimmen die experimentellen Chemilumineszenzkinetiken des Lucigenins in den untersuchten $O_2^{\cdot-}$ -bildenden Systemen qualitativ mit dem theoretischen Modell des Chemilumineszenz-Nachweises überein (Gleichung 22): die Chemilumineszenz konstanter Intensität entsprach einer konstanten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate im Xanthin/Xanthinoxidase System (Abb. 14B), während die glockenformige O_2 -Verbrauchsrate an stimulierten PMN durch die Chemilumineszenz von gleichartigem kinetischem Verlauf begleitet wurde (Kapitel 3.7.1.3.1).

Obwohl Lucigenin als eine $O_2^{\cdot-}$ -spezifische Lumineszenzprobe gilt, war seine Chemilumineszenz nur im Modellsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) vollständig SOD-sensitiv (Abb. 22). In allen Systemen mit Lipidmembranen (stimulierte Zellen, Mitochondrien oder SMP) war die Chemilumineszenz des Lucigenins hingegen nur zum Teil mit SOD hemmbar (Abb. 41 und Abb. 50), was sich zum Teil von Ergebnissen anderer eingesetzter Methoden unterscheidet. Die SOD-insensitive Komponente der Lucigenin-Chemilumineszenz kommt anscheinend dadurch zustande, daß Lucigeninmoleküle Lipidmembranen passieren können und eine emissive Reaktion in jenen Kompartments stattfinden, zu denen die hochmolekulare SOD keinen Zugang hat. In diesem Fall ist nur eine indirekte Überprüfung der Beteiligung von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen an der Chemilumineszenz möglich.

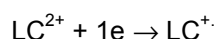
Bei der quantitativen Interpretation der $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate aus der Intensität der Chemilumineszenz stellte sich heraus, daß die Bildungsrate der Superoxidradikale nicht der einzige Parameter ist, welcher die Intensität der Lucigenin-Chemilumineszenz bedingt. In Analogie zur Fluoreszenz ist auch für die Chemilumineszenz zu erwarten, daß die unmittelbare Umgebung eines lumineszierenden Moleküls die Quantenausbeute und somit die Intensität der Chemilumineszenz beeinflussen kann. Wenn dies unberücksichtigt bleibt, kann es zu falschen quantitativen Schlußfolgerungen über die produzierte Superoxidbildungsrate kommen.

Die Effizienz strahlungsloser Dissipation der Energie eines angeregten Moleküls (k_4 in Reaktion 55) ist u.a. von der Anzahl der Bewegungsfreiheitsgrade abhängig. Da sich Lucigenin auf Grund seiner positiven Ladung an bestimmten Lipidmembranen anlagert [116], kann hierdurch die Intensität der Chemilumineszenz beeinflußt werden. Die Beschränkung der Bewegungsfreiheitsgrade des Lucigeninmoleküls innerhalb der Lipidphase würde in einer Verminderung von k_4 (Gleichung 22) resultieren. Nach Gleichung 22 hätte dies zufolge, daß die Intensität der Chemilumineszenz I_{ss} erhöht wird, ohne daß sich die $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate v ändert.

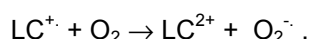
Auf diesen Effekt wurde die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Erhöhung der Chemilumineszenz-Intensität zurückgeführt, welche bei Anwendung des Lucigenins an zweiphasigen Systemen - aus Lipid- und wässrige Phase - aufgetreten ist. Die Membranen von stimulierten Zellen sowie die hydrophoben Bereiche des Albuminmoleküls mit den eventuell dort gebundenen Fettsäuren könnten einen Teil der Lucigeninmoleküle binden und dadurch die Intensität der Chemilumineszenz gemäß dem oben genannten Mechanismus vergrößern. Die Quantenausbeute und schließlich die Chemilumineszenz-Intensität würde in diesem Fall u.a. von dem Verteilungskoeffizienten der lumineszierenden Substanz (hier des Lucigenins) zwischen den beiden Phasen abhängen.

Auf den Zusammenhang zwischen der Chemilumineszenz-Intensität und den Bewegungsfreiheitsgraden eines Lucigeninmoleküls deuten verschiedene Literaturquellen hin, die eine Erhöhung der Chemilumineszenz-Intensität für Lucigenin dokumentieren, wenn dieses in Mizellen aus Didodecyl-Dimethylammoniumbromid (Übersicht in [138]), aus Linolensäure [70] sowie in β -Cyclodextrin (Übersicht in [138]) eingeschlossen wurde. Die Intensität der $O_2^{\cdot-}$ -abhängigen Chemilumineszenz des Lucigenins an enzymatischen Superoxidbildungsquellen wurde auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen von nicht-ionischen Detergentien (Triton X-100) erhöht, obwohl die produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate unverändert blieb [133].

Sogar eine mit SOD hemmbare Chemilumineszenz des Lucigenins kann nicht als qualitativ endgültiger Beweis der stattfindenden $O_2^{\cdot-}$ -Radikalbildung dienen. So wurde berichtet, daß Lucigenin in manchen biologischen Systemen selbst die Bildung der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale vermitteln kann [74,148]. Das kommt zustande, wenn Lucigenin nicht durch Superoxidradikale, sondern durch ein Enzym reduziert wird (Reaktion 57), dann autoxydiert, wobei ein Elektron auf Sauerstoff übergeht und ein $O_2^{\cdot-}$ -Radikal gebildet wird (Reaktion 58):



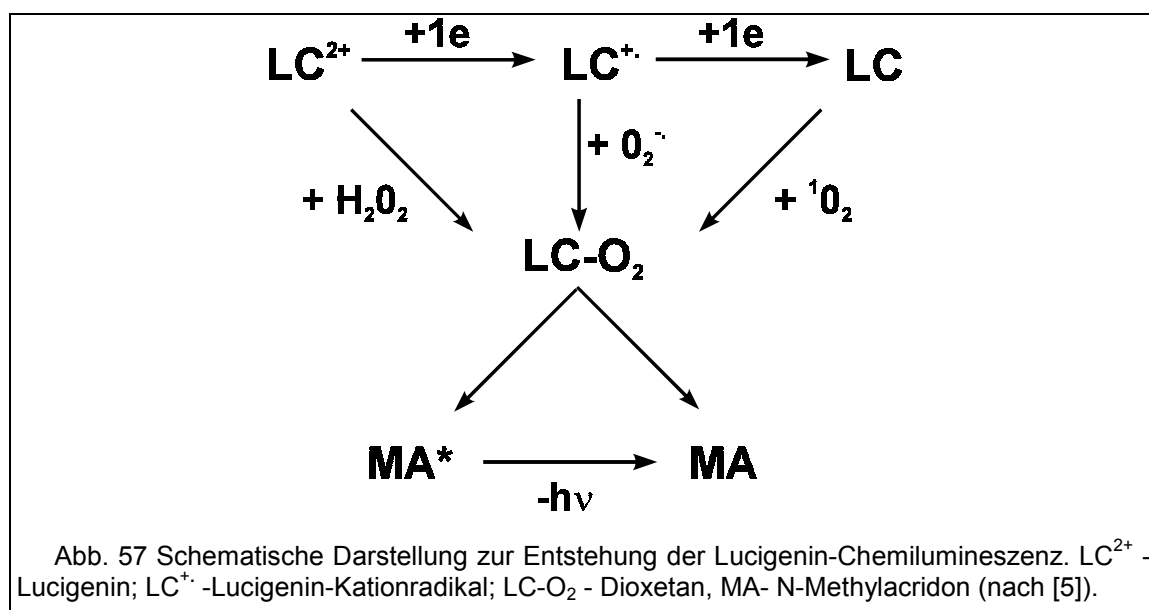
Reaktion 57



Reaktion 58

Das gebildete Superoxidradikal kann Lucigenin weiter reduzieren und dadurch zu einer SOD-sensitiven Chemilumineszenz in einem System führen, in dem ursprünglich keine $O_2^{\cdot-}$ -Radikale vorhanden waren.

In der Arbeit von Li et al. [72], welche die Redoxzyklisierung des Lucigenins beim $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an manchen biologischen Systemen bestätigt, wurde vorgeschlagen, dieses Problem durch den Einsatz niedrigerer Konzentrationen Lucigenins zu lösen. Ob Lucigenin zu einer zusätzlichen Radikalbildung beiträgt, wurde in [72] aus der Zunahme des Sauerstoffsverbrauchs in Anwesenheit des Lucigenins geschlossen. Nachdem unter einer bestimmten Konzentration des Lucigenins keine meßbare Zunahme des Sauerstoffsverbrauchs registriert wurde, während die Chemilumineszenz unter den gleichen Bedingungen noch detektierbar blieb, sind die Autoren zu dem Schluß gekommen, daß die Redoxzyklisierung des Lucigenins nur bei seiner Anwendung in hohen Konzentrationen zustande kommt. Es blieb jedoch unberücksichtigt, daß die Chemilumineszenz eine viel empfindlichere Methode darstellt als die polarographische Messung des Sauerstoffsverbrauchs, so daß die Redoxzyklisierung beim Einsatz niedrigerer Konzentrationen des Lucigenins unter der

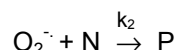


Nachweisgrenze der polarographischen Methode liegen kann.

Somit ist die Anwendung der Lucigenin-Chemilumineszenz zum $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis an biologischen Systemen wegen einer möglichen Redoxzyklisierung des Lucigenins, welche zu einer zusätzlichen $O_2^{\cdot-}$ -Bildung beitragen kann und schwer nachvollziehbar ist, beschränkt. Die Verteilung des Lucigenins zwischen Lipid- und wässriger Phase kann die Quantenausbeute der Chemilumineszenz beeinflussen und somit einen quantitativen Nachweis der Superoxidbildung zusätzlich erschweren.

4.4 Spintrapping-Technik im ESR-Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung.

Da $O_2^{\cdot-}$ -Radikale direkt nur bei Tieftemperaturen über die ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden können, wird die Spintrapping-Technik für den ESR-Nachweis der Superoxidradikale bei Raumtemperaturen eingesetzt. Beim Nachweis der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung mittels Spintrapping-Technik reagiert ein geeignetes Spintrap N mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen und das gebildete Addukt P wird durch die ESR-Spektroskopie nachgewiesen:



Reaktion 59

Im Unterschied zu den photometrischen und chemiluminometrischen Methoden, wo das nachweisbare Produkt stabil ist bzw. sofort zerfällt, stellt der ESR-Nachweis eine mittlere Situation zwischen den beiden genannten Extremen dar. Die entsprechenden $O_2^{\cdot-}$ -Spintrap-Addukte sind meist instabil, die Halbwertszeit ist jedoch mit der gesamten Meßdauer vergleichbar. Diese Besonderheit erfordert eine spezielle mathematische Betrachtung, um die Möglichkeit eines quantitativen Nachweises von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen mittels Spintrapping zu analysieren.

Hier wird das vereinfachte Modell betrachtet, nämlich wenn der Zerfall eines Spinadduktes annähernd mit einer Reaktion erster Ordnung beschrieben werden kann:



Reaktion 60

Dies muß auch im Gleichungssystem berücksichtigt werden:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = v - k_1 S^2 - k_2 SN \\ \frac{dP}{dt} = k_2 SN - k_3 P \end{cases}$$

Gleichung 23

Dieses Differential-Gleichungssystem ist in analytischer Form nicht lösbar, kann jedoch vereinfacht werden, wenn die tatsächlichen Konstanten miteinbezogen werden. Lassen die Konzentration des Spintraps N und die Geschwindigkeitskonstante k_2 die Bedingung $k_2 SN \gg k_1 S^2$ gelten, dann kann die Komponente der $O_2^{\cdot-}$ -Dismutation $k_1 S^2$ in der kinetischen Betrachtung vernachlässigt werden. In diesem Fall ist die charakteristische Zeit τ_s bis zum Erreichen der stationären Konzentration der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale annäherungsweise als τ_s anzunehmen. Um den quantitativen Wert für τ_s zu erhalten, wurde die experimentelle Konzentration des Spintraps N im Bereich 2.5-100mM und die Reaktionskonstante k_2 von der Größenordnung $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [46,49] eingesetzt. Daraus kann τ_s mit

$$\tau_s \leq \frac{1}{2,5 \cdot 10^{-3} \cdot 10} \text{ s} = 40 \text{ s} \text{ berechnet werden. Im Vergleich zu der gesamten Meßzeit (ca. 15 min)}$$

ist τ_s vernachlässigbar gering. Das bedeutet, daß die stationäre Konzentration der Superoxidradikale S_{ss} schon nach maximal 40 s erreicht wird und mit ausreichend guter Genauigkeit für alle weiteren Berechnungen anstatt $S(t)$ eingesetzt werden kann. Die S_{ss} wird aus der Bedingung des stationären Zustandes errechnet:

$$\frac{dS}{dt} \approx v - k_2SN = 0, \text{ und } S_{ss} \approx \frac{v}{k_2N}.$$

Gleichung 24

Da $\tau_s \ll t$ ist, läuft die Akkumulation des Adduktes P bei der stationären Konzentration der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale S_{ss} ab. Daher kann die Konzentration $S=S(t)$ in Gleichung 23 mit S_{ss} (Gleichung 24) ersetzt werden:

$$\begin{aligned} \frac{dP}{dt} &= k_2NS - k_3P \approx k_2NS_{ss} - k_3P = k_2N \cdot \frac{v}{k_2N} - k_3P; \\ \frac{dP}{dt} &= v - k_3P. \end{aligned}$$

Gleichung 25

Die aus der Vereinfachung des System erhaltene Gleichung 25 hat eine analytische Lösung, welche die Konzentration des gebildeten Spinadduktes **P** beim Nachweis einer konstanten $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate **v** beschreibt, wenn das Addukt eine Halbwertszeit $\tau = \frac{1}{k_3}$ aufweist:

$$P(t) = \frac{v}{k_3} (1 - e^{-k_3t}) = v\tau \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$$

Gleichung 26

Wie aus Gleichung 26 ersichtlich, wird die Konzentration des Adduktes P(t) und schließlich die Amplitude des ESR-Signals nicht nur durch die produzierte $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate **v** bestimmt, sondern hängt auch von der Halbwertszeit τ des Adduktes ab. Wenn die Bedingung $\tau \ll t$ erfüllt ist, dann ist die stationäre Konzentration des Adduktes erreicht.

Die Empfindlichkeit einer Spintrapping-Methode in Sinne der minimalen detektierbaren Superoxidbildungsrate hängt somit ebenfalls von der Halbwertszeit des $O_2^{\cdot-}$ -Adduktes ab. Da die untere Grenze der mittels ESR detektierbaren Konzentrationen im nanomolaren Bereich liegt, ergibt sich die minimale nachweisbare $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate v_{min} aus der Formel:

$$\frac{v}{k_3} \gg P_{min}; \text{ und } v_{min} \sim 10 \cdot P_{min} k_3 \gg P_{min} k_3$$

wo $P_{min} \approx 10\text{nM}$ - die minimale mittels ESR detektierbare Konzentration paramagnetischer Produkte ist.

Für DMPO ($k_3=0.02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) läßt sich die minimale nachweisbare $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate $v_{min}=2\text{nMs}^{-1}=0.12\mu\text{M min}^{-1}$ berechnen, während für DEPMPO ($k_3=0.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) diese $v_{min}=0.07 \text{ nM s}^{-1}=4.2\text{nM min}^{-1}$ beträgt. Der Vergleich der minimalen nachweisbaren $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate für die beiden Spintraps ergibt, daß mit DEPMPO eine 30-mal geringere $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate nachweisbar ist, als mit DMPO.

4.4.1 DMPO und DEPMPO als Spintraps für $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis.

Beide Spintraps - DMPO und DEPMPO - reagieren mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen überwiegend in der wässrigen Phase [15,49], wobei Addukte mit charakteristischen ESR-Spektren entstehen. Wenn ein Superoxid-Addukt eines der beiden Spintraps detektiert wird, zeigt dies das Auftreten der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale eindeutig an. Die Instabilität des Superoxid-Adduktes von DMPO läßt die vorteilhafte Selektivität des ESR-Nachweises mit diesem Spintrap jedoch nicht entfalten. Das Problem liegt darin, daß das gebildete DMPO- Superoxid-Addukt (DMPO-OOH-Addukt) in DMPO-Hydroxyl-Addukt (DMPO-OH-Addukt)

sowie in diamagnetische Produkte zerfällt [32,46,96]. Das Auftreten des DMPO-OH-Adduktes in den $O_2^{\cdot-}$ -produzierenden biologischen Systemen hat oft zu den Schlußfolgerungen geführt, daß diese Systeme neben $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen auch Hydroxyl-Radikale produzieren, was jedoch nicht immer der Fall ist [30,68,121,145].

Da das DMPO-OH-Addukt auch direkt über Spintrapping von Hydroxylradikalen gebildet werden kann, sind zusätzliche Experimente notwendig, um den Ursprung von DMPO-OH-Addukten zu klären. Hierfür werden Ethanol oder DMSO der Reaktionsmischung zugegeben, die mit OH-Radikalen reagieren und Kohlenstoff-zentrierte Radikal-Addukte mit DMPO bilden können [103]. Diese sind an den charakteristischen ESR-Spektren zu erkennen. Ist die Bildung von DMPO-OH-Addukten tatsächlich über die Reaktion mit Hydroxylradikalen verlaufen, dann wird statt eines DMPO-OH-Adduktes in ein Kohlenstoff-zentriertes DMPO-Radikal-Addukt in Anwesenheit des Lösungsmittels nachgewiesen. Dieser Zugang zur Klärung des Ursprungs von DMPO-OH-Addukt ist jedoch nicht immer an biologischen Systemen realisierbar, da DMSO und Ethanol diese Systeme beeinflussen können.

Die Selektivität der Spintrapping-Methode für den $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis wurde mit Anwendung des phosphorylierten DMPO (DEPMPO) wesentlich verbessert. Das DEPMPO-OOH-Addukt ist ca. 15mal stabiler als das DMPO-OOH-Addukt (Abb. 30, [49]) und zerfällt mit Bildung diamagnetischer Produkte. Die ESR-Spektren von DEPMPO-OH- und DEPMPO-OOH-Addukten sind - genauso wie im Falle von DMPO - verschieden (Kapitel 3.6.2), was eine genauere Identifizierung sowie einen gleichzeitigen Nachweis der Radikalspezies ermöglicht. Mit DEPMPO konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, daß das eingesetzte Modellsystem Xanthin/Xanthinoxidase hauptsächlich $O_2^{\cdot-}$ - und nicht Hydroxyl-Radikale produziert (Abb. 28). Das Spintrapping mit DMPO in demselben Xanthin/Xanthinoxidase System hat außerdem das Signal vom DMPO-OH-Addukt angezeigt (Abb. 26), welches dem Zerfall des DMPO-OOH-Adduktes zugeordnet wurde.

Die publizierten Daten über die Sauerstoffspezies, die an stimulierten Zellen gebildet werden, sind kontrovers. Das Spintrapping mit DMPO hat in diesem System die Bildung von entweder Superoxid- oder Hydroxyl-Addukten oder von beiden gleichzeitig angezeigt [121,145,152]. Eisen, das an bei Zellaktivierung freigesetzte Protein Lactoferrin gebunden ist, wurde als Katalysator der Hydroxyl-Radikalbildung aus Wasserstoffperoxid vermutet [14,66].

Wenn die Hydroxylradikale, deren Bildung über das Spintrapping mit DMPO an stimulierten PMN registriert wurde, tatsächlich in diesem System entstehen, dann sollten sie ebenfalls mit DEPMPO nachweisbar sein, was jedoch nicht der Fall war. Mit DEPMPO wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung von ausschließlich Superoxidradikalen an PMA-stimulierten PMN nachgewiesen (Abb. 45). Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen beider Spintraps mit Hydroxylradikalen sind groß genug ($\approx 10^9 M^{-1} s^{-1}$ [46,49]), um bei den eingesetzten Konzentrationen des Spintraps eine stattfindende Hydroxylradikalbildung anzuzeigen.

Für eine qualitative Bestimmung gebildeter Sauerstoffspezies mittels Spintrapping muß berücksichtigt werden, daß die Reaktion zwischen Superoxidradikal und zugesetztem Spintrap mit der $O_2^{\cdot-}$ -Dismutation konkurriert und die Bildung von Wasserstoffperoxid konzentrationsabhängig verringert [31]. Hierdurch kann die H_2O_2 -abhängige Bildung von Hydroxyl-Radikalen in einem zu untersuchenden System unterdrückt werden. Die in den Experimenten an stimulierten Zellen eingesetzte DEPMPO-Konzentration von 25mM hat die $O_2^{\cdot-}$ -Dismutation nicht völlig verhindert, so daß die eventuell gebildeten Hydroxyl-Radikale immer noch nachgewiesen werden konnten.

Da DMPO mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen relativ langsam reagiert [46], muß zum Superoxid-Nachweis eine Spintrap-Konzentration von 0.05-0.1M eingesetzt werden, was für biologische Objekte, u.a. für die Zellen, toxisch ist und die Auswirkung auf die Radikalbildung hat [145]. Zudem können zytosolische Enzyme der geschädigten Zellen das DMPO-OOH-Addukt in ein DMPO-OH-Addukt umwandeln und somit die Selektivität des Spintrappings mit DMPO weiter reduzieren [145]. Das phosphorylierte Derivat DEPMPO kann hingegen wegen besserer Stabilität seines Superoxid-Adduktes in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden, die noch keine toxische Wirkung auf biologische Systeme zeigen (Tabelle 6), [108].

Aber auch DEPMPO ist von Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Systemen nicht immer frei. So hat das Spintrapping mit DEPMPO zum Nachweis der Superoxidbildung an den mit Antimycin A gehemmten Mitochondrien ergeben, daß in diesem System hauptsächlich das DEPMPO-OH-Addukt gebildet wird, dieses jedoch eine deutlich geringere Stabilität als in dem Modellsystem hat

(Abb. 54). Dieser Befund ist vermutlich auf die Wechselwirkungen des Adduktes mit der mitochondrialen Atmungskette zurückzuführen, womit auch das Fehlen des weniger stabilen DEPMPO-OOH-Adduktes erklärt werden kann.

Da die Spintrapping-Technik vor allem mit DEPMPO eine gute Selektivität des $O_2^{\cdot-}$ -Nachweises aufzeigt, ist es wichtig, die Möglichkeiten eines quantitativen Nachweises mit dieser Methode zu analysieren. Wie Gleichung 26 zeigt, ist die Konzentration des gebildeten Superoxidadduktes **P** mit der Superoxidbildungsrate **v** verbunden. Um die $O_2^{\cdot-}$ -Bildungsrate **v** aus der Konzentration **P** zu ermitteln, muß ein zusätzlicher Parameter, die Halbwertszeit des Adduktes τ in dem zu untersuchenden System, bekannt sein. Je nach System kann die Halbwertszeit des Superoxidadduktes verschieden sein und läßt sich annähernd aus der Zerfallskinetik bestimmen. Der tatsächliche Wert für τ kann in Anwesenheit von Superoxidradikalen geringer sein, da Superoxid-abhängige Oxidationsreaktionen diese weiter verringern können.

5 Schlußfolgerungen.

5.1 Qualitative Beurteilung der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweissystemen.

Die Anwendung der gebräuchlichen Methoden zum Nachweis der Superoxidradikalbildung an biologischen Systemen ist mit einer großen Unsicherheit verbunden, da die Bildung der $O_2^{\cdot-}$ -bezogenen Indikatoren auch über andere Reaktionswege möglich ist. Da alle Nachweismethoden außer Spintrapping auf der Oxidation oder Reduktion der jeweiligen Nachweissubstanz durch $O_2^{\cdot-}$ -Radikale beruhen, sind auch $O_2^{\cdot-}$ -unabhängige oxidativ oder reduktiv wirkende Komponenten biologischer Systemen in der Lage, mit der Nachweissubstanz zu reagieren, wodurch ein selektiver $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis beeinträchtigt wird.

Im Allgemeinen gilt, daß der qualitative $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis um so sicherer ist, je weniger Reaktionsschritte zur Bildung des nachweisbaren Reaktionsproduktes erforderlich sind und je spezifischer die Bildung des Nachweisproduktes für eine Reaktion mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen ist. Die in der vorliegenden Untersuchung erarbeiteten Ergebnisse ermöglichen eine Reihung der Methoden nach ihre Zuverlässigkeit für die biologische Anwendung:

Spintrapping (DEPMPO)>Cytochrom c>Lucigenin>Epinephrin>NBT>Luminol.

D.h. über die Spintrapping-Technik mit DEPMPO lassen sich die $O_2^{\cdot-}$ -Radikale am sichersten nachweisen, während die Selektivität der Luminol-Methode am geringsten ist.

5.2 Quantitative Beurteilung der $O_2^{\cdot-}$ -Nachweissystemen.

Die Eignung der vorhandenen Methoden, für eine zuverlässige quantitative Aussage über die Bildungsgeschwindigkeit der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale hängt von verschiedenen Parameter wie Reaktionsstöchiometrie, Geschwindigkeitskonstante der Reaktion der Nachweissubstanz mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen sowie der Stabilität des Nachweisproduktes ab. Die Effizienz der Methoden, $O_2^{\cdot-}$ -Radikale quantitativ zuverlässig nachzuweisen, kann unter Berücksichtigung dieser Parameter in der folgenden Reihe mit absteigender Eignung zusammengefaßt werden:

Cytochrom c>Spintrapping (DEPMPO)>Lucigenin>Epinephrin>NBT>Luminol.

Auf Grund der theoretischen Berechnungen und experimentellen Erfahrungen wurde die Cytochrom c-Methode als der empfindlichste photometrische Nachweis erkannt. Das Spintrapping mit DEPMPO erwies sich 30-mal empfindlicher als mit DMPO, während die Lucigenin-Methode empfindlicher als die Luminol-Methode ist.

6 Literaturliste.

1. Bergmeyer, H.U. ed. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie GmbH; 1974.
2. Activated forms of oxygen. In: R.V. Bensasson, E.J. Laud and T.G. Truscott, eds. Excited states and free radicals in biology and medicine. ; 101-141; 1997.
3. Afanas'ew, I. Production of Oxygen Radicals by Cells. In: Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications. Vol. II. ; 87-134; 1989.
4. Albrecht, D. and Jungi, T.W. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **54**(4); 300-306; 1993.
5. Allen, R.C. Phagocytic Leukocyte Oxygenation Activities and Chemiluminescence: A Kinetic Approach to Analysis. *Methods of Enzymology* **133**; 449-493; 1986.
6. Allen, R.C., Yevich, S.J., Orth, R.W., and Steele, R.H. The superoxide anion and singlet molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**(3); 909-917; 1974.
7. Antal M, Rozsnyay Z, Genti G, and Meretey K. Comparison of luminol and lucigenin-enhanced chemiluminescence of granulocytes. Study of antiinflammatory drugs. 11-17; 1985.
8. Araki, T., Chikamori, K., Sasaki, K., Kawata, S., Minami, S., and Yamada, M. Topographic estimations by component spectroanalysis of two formazans of nitroblue tetrazolium in tissue sections. *Histochemistry* **86**(6); 567-572; 1987.
9. Arnhold, J., Mueller, S., Arnold, K., and Grimm, E. Chemiluminescence intensities and spectra of luminol oxidation by sodium hypochlorite in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biolumin. Chemilumin.* **6**(3); 189-192; 1991.
10. Arnhold, J., Mueller, S., Arnold, K., and Sonntag, K. Mechanisms of inhibition of chemiluminescence in the oxidation of luminol by sodium hypochlorite. *J. Biolumin. Chemilumin.* **8**(6); 307-313; 1993.
11. Azzi, A., Montecucco, C., and Richter, C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **65**(2); 597-603; 1975.
12. Babior, B.M., Kipnes, R.S., and Curnutte, J.T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**(3); 741-744; 1973.

13. Bagchi, D., Prasad, R., and Das, D.K. Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**(1); 52-57; 1989.

14. Bannister, J.V. and Bannister, W.H. Production of Oxygen-Centered Radicals by Neutrophils and Macrophages as Studied by Electron Spin Resonance (ESR). *Environmental Health Perspectives* **64**; 37-43; 1985.

15. Barbati, S., Clement, J.L., Olive, G., Roubaud, V., Tuccio, B., and Tordo, P. ³¹P Labeled cyclic nitrones: a new class of spin traps for free radicals in biological milieu. In: F. Minisci, ed. *Free Radicals in Biology and Environment*. Kluwer Academic Publishers; 39-47; 1997.

16. Barber, D.A. and Harris, S.R. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am. Pharm. NS34*(9); 26-35; 1994.

17. Beauchamp, C. and Fridovich, I. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem* **245**(18); 4641-4646; 1970.

18. Beauchamp, C. and Fridovich, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.* **44**; 276-287; 1971.

19. Bielski, B.H.J. Generation of Superoxide Radicals in Aqueous and Ethanolic Solutions by Vacuum-UV Photolysis. *Methods of Enzymology* **105**; 81-88; 1984.

20. Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E., and Arudi, R.L. Reactivity of HO₂/O₂⁻ Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **14**(4); 1041-1099; 1985.

21. Bielski, B.H.J., Shiue, G.G., and Bajuk, S. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂⁻ and O₂⁻ radicals. *J. Phys. Chem.* **84**; 830-833; 1980.

22. Bindoli, A., Deeble, D.J., Rigobello, M.P., and Galzigna, L. Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1016**(3); 349-356; 1990.

23. Bode, C., Goebell, H., and Stahler, E. [Elimination of errors caused by turbidity in the determination of protein by the biuret method]. *Z. Klin. Chem Klin. Biochem.* **6**(5); 418-422; 1968.

24. Bolann, B.J., Tangeras, A., and Ulvik, R.J. Determination of manganese superoxide dismutase activity by direct spectrophotometry. *Free Rad. Res.* **25**(6); 541-546; 1996.

25. Bors, W., Michel, C., Saran, M., and Lengfelder, E. Kinetic investigations of the autoxidation of adrenalin. *Z. Naturforsch. C.* **33**(11-12); 891-896; 1978.

26. Bors, W., Michel, C., Saran, M., and Lengfelder, E. The involvement of oxygen radicals during the autoxidation of adrenalin. *Biochim. Biophys. Acta* **540**(1); 162-172; 1978.
27. Bors, W., Saran, M., Michel, C., Lengfelder, E., Fuchs, C., and Spottl, R. Pulse-radiolytic investigations of catechols and catecholamines. I. Adrenaline and adrenochrome. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem Med.* **28**(4); 353-371; 1975.
28. Boveris, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods of Enzymology* **105**; 429-435; 1984.
29. Brantley, R.E., Jr., Smerdon, S.J., Wilkinson, A.J., Singleton, E.W., and Olson, J.S. The mechanism of autooxidation of myoglobin. *J. Biol. Chem* **268**(10); 6995-7010; 1993.
30. Britigan, B.E., Pou, S., Rosen, G.M., Lilleg, D.M., and Buettner, G.R. Hydroxyl radical is not a produkt of the reaktion of xanthine oxidase and xanthine. *J. Biol. Chem.* **265**(29); 17533-17538; 1990.
31. Britigan, B.E., Roeder, T.L., and Buettner, G.R. Spin traps inhibit formation of hydrogen peroxide via the dismutation of superoxide: implications for spin trapping the hydroxyl free radical. *Biochim. Biophys. Acta* **1075**(3); 213-222; 1991.
32. Buettner, G.R. On the reaction of superoxide with DMPO/.OOH. *Free Radic. Res. Commun.* **10**(1-2); 11-15; 1990.
33. Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**(2); 535-543; 1993.
34. Buettner, G.R. and Jurkiewicz, B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* **145**(5); 532-541; 1996.
35. Buettner, G.R. and Mason, R.P. Spin-trapping methods for detecting superoxide and hydroxyl free radicals *in vitro* and *in vivo*.. *Methods of Enzymology* **186**; 127-133; 1990.
36. Enzyme histochemistry. New York, London: Academic Press; 1962.
37. Butcher, R.G. The measurement in tissue sections of the two formazans derived from nitroblue tetrazolium in dehydrogenase reactions. *Histochem. J.* **10**(6); 739-744; 1978.
38. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I., and Stoppani, A.O. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**(2); 248-257; 1977.
39. Carreras, M.C., Riobo, N.A., Pargament, G.A., Boveris, A., and Poderoso, J.J. Effects of

Respiratory Burst Inhibitors on Nitric Oxide Production by Human Neutrophils. *Free Rad. Res.* **26**; 325-334; 1997.

40. Castro, L., Alvarez, M.N., and Radi, R. Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**(1); 179-188; 1996.

41. Catz, S.D., Carreras, C., and Poderoso, J.J. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminal-dependent chemiluminescence. *Free Radical Biology & Medicine* **19**(6); 741-748; 1995.

42. Clifford, D.P. and Repine, J.E. Measurement of Oxidizing Radicals by Polymorphonuclear Leukocytes. *Methods of Enzymology* **105**; 393-398; 1984.

43. Cuperus, R.A., Muijsers, A.O., and Weber, R. The superoxide dismutase activity of myeloperoxidase; formation of compound III. *Biochim. Biophys. Acta* **871**(1); 78-84; 1986.

44. Faist, V. Parameter des Radikalstoffwechsels isolierter Skelettmuskelmitochondrien. Einflu von Duchenne-Muskeldystrophie, physischer Belastung und Alterns. 1995.(Abstract)

45. Feig, D.I., Reid, T.M., and Loeb, L.A. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* **54**(7 Suppl); 1890s-1894s; 1994.

46. Finkelstein, E., Rosen, G.M., and Rauckman, E.J. Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J. Am. Chem Soc.* **102**; 4994-4999; 1980.

47. Finkelstein, E., Rosen, G.M., Rauckman, E.J., and Paxton, J. Spin trapping of superoxide. *Mol. Pharmacol.* **16**(2); 676-685; 1979.

48. Florence, T.M. The degradation of cytochrome c by hydrogen peroxide. *J. Inorg. Biochem.* **23**(2); 131-141; 1985.

49. Frejaville, C., Karoui, H., Tuccio, B., Le Moigne, F., Culcasi, M., Pietri, S., Lauricella, R., and Tordo, P. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. *J. Med. Chem.* **38**(2); 258-265; 1995.

50. Fridovich, I. Quantitative Aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthin oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **245**(16); 4053-4057; 1970.

51. Fujii, H. and Kakinuma, K. Direct measurement of superoxide anion produced in biological systems by ESR Spectrometry: a pH-Jump method. *J. Biochem.* **108**; 983-987; 1990.

52. Gerber, C.E., Kuci, S., Zipfel, M., Niethammer, D., and Bruchelt, G. Phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with myeloperoxidase deficiency. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **34**(11); 901-908; 1996.
53. Gille, L. and Nohl, H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **23**(5); 775-782; 1997.
54. Goldstein, J.M., Ross, D., Kaplan, H.B., and Weissmann, G. Complement and Immunoglobulins Stimulate Superoxide Production by Human Leukocytes Independently of Phagocytosis. *The Journal of Clinical Investigation* **56**(Nov.); 1155-1163; 1975.
55. Green, T.R. and Wu, D.E. The NADPH:O₂ Oxidoreductase of Human Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* **261**(13); 6010-6015; 1986.
56. Grootveld, M. and Halliwell, B. An aromatic hydroxylation assay for hydroxyl radicals utilizing high-performance liquid chromatography (HPLC). Use to investigate the effect of EDTA on the Fenton reaction. *Free Radic. Res. Commun.* **1**(4); 243-250; 1986.
57. Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* **172**(2); 245-249; 1984.
58. Gutteridge, J.M.C., Richmond, R., and Halliwell, B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* **184**(2); 469-472; 1979.
59. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press; 1989.
60. Haseloff, R.F., Ebert, B., and Roeder, B. Generation of free radicals by photoexcitation of pheophorbide alpha, haematoporphyrin and protoporphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B.* **3**(4); 593-602; 1989.
61. Johansen, K.S. Nitroblue tetrazolium slide test. Use of the phorbol-myristate-acetate-stimulated NBT-reduction slide test for routine and prenatal detection of chronic granulomatous disease and diagnosis of heterozygous carriers. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.* **91**(6); 349-354; 1983.
62. Kakinuma, K. and Minakami, S. Effects of fatty acids on superoxide radical generation in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **538**(1); 50-59; 1978.
63. Kalyanaraman, B., Felix, C.C., and Sealy, R.C. Electron Spin Resonance-Spin Stabilisation of Semiquinones Produced during Oxidation of Epinephrine and its Analogues. *The Journal of Biological Chemistry* **259**(1); 354-358; 1984.
64. Karoui, H., Hogg, N., Frejaville, C., Tordo, P., and Kalyanaraman, B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-

spin trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem* **271**(11); 6000-6009; 1996.

65. Kettle, A.J. and Winterbourn, C.C. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem. J.* **252**(2); 529-536; 1988.

66. Klebanoff, S.J. and Waltersdorff, A.M. Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. *J. Exp. Med.* **172**(5); 1293-1303; 1990.

67. Koppenol, W.H. The reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide: evidence against hydroxyl radical formation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**(4); 281-285; 1985.

68. Kuppusamy, P. and Zweier, J.L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem* **264**(17); 9880-9884; 1989.

69. Kuthan, H., Ullrich, V., and Estabrook, R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem. J.* **203**(3); 551-558; 1982.

70. Laihia, J.K., Jansen, C.T., and Ahotupa, M. Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity. *Free Radic. Biol. Med.* **14**(5); 457-461; 1993.

71. Cytochromes. London and New York: Academic Press; 1973.

72. Li, Y.B., Zhu, H., Kuppusamy, P., ROUBAUD, V., Zweier, J.L., and Trush, M.A. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J. Biol. Chem.* **273**(4); 2015-2023; 1998.

73. Liochev, S.I. and Fridovich, I. Superoxide from Glucose Oxidase or from Nitroblue Tetrazolium? *Arch. Biochem. Biophys.* **318**(2); 408-410; 1995.

74. Liochev, S.I. and Fridovich, I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**(1); 115-120; 1997.

75. Lissi, E., Salim Hanna, M., Pascual, C., and del Castillo, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology & Medicine* **18**(2); 153-158; 1995.

76. Lloyd, R.V. and Mason, R.P. Evidence against transistion metal-independent hydroxyl radical generation by xanthin oxidase. *J. Biol. Chem.* **265**(28); 16733-16736; 1990.

77. Lokesh, B.R. and Cunningham, M.L. Further studies on the formation of oxygen radicals by potassium superoxide in aqueous medium for biochemical investigations. *Toxicol. Lett.* **34**(1); 75-84; 1986.

78. Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohe, L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* **42**(1); 68-72; 1974.
79. Lynch, R.E. and Fridovich, I. Autoinactivation of xanthine oxidase: the role of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **571**(2); 195-200; 1979.
80. Markert, M., Andrews, P.C., and Babior, B.M. Measurement of O_2^- Production by Human Neutrophils. The Preparation and Assay of NADPH Oxidase-Containing Particles from Human Neutrophils. *Methods of Enzymology* **105**; 358-364; 1984.
81. Matthews, S.B., Henderson, A.H., and Campbell, A.K. The adrenochrome pathway: the major route for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **17**(4); 339-348; 1985.
82. Mayo, L.A. and Curnutte, J.T. Kinetic Microplate Assay for Superoxide Production by Neutrophils and Other Phagocytic Cells. *Methods of Enzymology* **186**; 567-565; 1990.
83. McCord, J.M. and Day, E.D., Jr. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* **86**(1); 139-142; 1978.
84. McCord, J.M. and Turrens, J.F. Mitochondrial Injury by Ischemia and Reperfusion. In: Anonymous Molecular basis of mitochondrial pathology. San Diego: Academic Press, Inc. 173-195; 1994.
85. McNally, J.A. and Bell, A.L. Myeloperoxidase-based chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Biolumin. Chemilumin.* **11**(2); 99-106; 1996.
86. Meerhof, L.J. and Roos, D. Heterogeneity in chronic granulomatous disease detected with an improved nitroblue tetrazolium slide test. *J. Leukoc. Biol.* **39**(6); 699-711; 1986.
87. Merenyi, G., Lind, J., and Eriksen, T.E. The reactivity of superoxide (O_2^-) and its ability to induce chemiluminescence with luminol. *Photochem. Photobiol.* **41**(2); 203-208; 1985.
88. Merenyi, G., Lind, J., and Eriksen, T.E. Luminol Chemiluminescence: Chemistry, Excitation, Emitter. *J. Biolumin. Chemilumin.* **5**; 53-56; 1990.
89. Miesel, R., Hartung, R., and Kroeger, H. Priming of NADPH oxidase by tumor necrosis factor alpha in patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation* **20**(4); 427-438; 1996.
90. Miller, D.M., Buettner, G.R., and Aust, S.D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **8**(1); 95-108; 1990.

91. Mishin, V., Pokrovsky, A., and Lyakhovich, V.V. Interactions of some acceptors with superoxide anion radicals formed by the NADPH-specific flavoprotein in rat liver microsomal fractions. *Biochem. J.* **154**(2); 307-310; 1976.
92. Misra, H.P. and Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* **247**(10); 3170-3175; 1972.
93. Morehouse, L.A., Thomas, C.E., and Aust, S.D. Superoxide generation by NADPH-cytochrome P-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**(1); 366-377; 1984.
94. Morel, F., Dianoux, A.C., and Vignais, P.V. Superoxide Anion Measurement by sulfonated Phenyl Isothiocyanate cytochrome c. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **156**(3); 1175-1181; 1988.
95. Nakamura, M. and Nakamura, S. One- and two-electron oxidations of luminol by peroxidase systems. *Free Radic. Biol. Med.* **24**(4); 537-544; 1998.
96. Nohl, H. [Biological and gerontological significance of oxygen]. *Aktuelle. Gerontol.* **12**(6); 195-199; 1982.
97. Nohl, H. Is redox-cycling ubiquinone involved in mitochondrial oxygen activation? *Free Radic. Res. Commun.* **8**(4-6); 307-315; 1990.
98. Nohl, H. Nitric oxide and related radicals. In: G. Poli, E. Albano and M.U. Dianzani, eds. Free radicals from basic science to medicine. Basel: Birkhäuser; 38-46; 1993.
99. Nohl, H. Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann. Biol. Clin. Paris.* **52**(3); 199-204; 1994.
100. Nohl, H. Biologie und Toxikologie des Sauerstoffs. In: S. Uranüs, ed. Chirurgische Forschung. München, Bern, Wien, New York: Zuckerschwerdt Verlag; 59-80; 1994.
101. Nohl, H. and Hegner, D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.* **82**(2); 563-567; 1978.
102. Nohl, H., Hegner, D., and Summer, K.H. Responses of mitochondrial superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities to aging. *Mech. Ageing Dev.* **11**(3); 145-151; 1979.
103. Nohl, H. and Jordan, W. The biochemical role of ubiquinon and ubiquinone-derivatives in the generation of hydroxyl-radicals from hydrogen peroxide. In: W. Bors, M. Saran and D. Tait, eds.

Oxygen radicals in chemistry and biology. Berlin, New York: Walter de Gruyter; 155-163; 1984.

104. Nohl, H. and Jordan, W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**(2); 533-539; 1986.

105. O'Brien, P.J. Superoxide production. *Methods of Enzymology* **105**; 370-378; 1984.

106. Papa, S. and Skulachev, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* **174**(1-2); 305-319; 1997.

107. Parthasarathy, S. and Santanam, N. Mechanisms of oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **5**(5); 371-375; 1994.

108. Pietri, S., Liebgott, T., Frejaville, C., Tordo, P., and Culcasi, M. Nitron spin traps and their pyrrolidine analogs in myocardial reperfusion injury: hemodynamic and ESR implications. *Eur. J. Biochem.* 1998.

109. Piper, H.M., Noll, T., and Siegmund, B. Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc. Res.* **28**(1); 1-15; 1994.

110. Popov, I.N. and Lewin, G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity: II. Testing of nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* **17**(3); 267-271; 1994.

111. Powis, G. Hepatic microsomal metabolism of epinephrine and adrenochrome by superoxide-dependent and -independent pathways. *Biochem. Pharmacol.* **28**(1); 83-89; 1979.

112. Radi, R. Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods of Enzymology* **269**; 354-366; 1996.

113. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem* **266**(7); 4244-4250; 1991.

114. Radi, R., Cosgrove, T.P., Beckman, J.S., and Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem. J.* **290**(Pt 1); 51-57; 1993.

115. Radi, R., Turrens, J.F., and Freeman, B.A. Cytochrome c-Catalyzed Membrane Lipid Peroxidation by Hydrogen Peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**(1); 118-125; 1991.

116. Rembish, S.J. and Trush, M.A. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **17**(2); 117-126; 1994.

117. Repine, J.E., Rasmussen, B., and White, J.G. An improved nitroblue tetrazolium test using phorbol myristate acetate-coated coverslips. *Am. J. Clin. Pathol.* **71**(5); 582-585; 1979.
118. Rest, R.F. Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria. *Methods of Enzymology* **236**; 119-136; 1994.
119. Robinson, E.E., Maxwell, S.R., and Thorpe, G.H. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radic. Res.* **26**(3); 291-302; 1997.
120. Rosen, G.M., Finkelstein, E., and Rauckman, E.J. A Method for the Detection of Superoxide in Biological Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **215**(2); 367-378; 1982.
121. Rosen, H. and Klebanoff, S.J. Hydroxyl radical generation by polymorphonuclear leukocytes measured by electron spin resonance spectroscopy. *J. Clin. Invest.* **64**(6); 1725-1729; 1979.
122. Roubaud, V., Sankarapandi, S., Kuppusamy, P., Tordo, P., and Zweier, J.L. Quantitative Measurement of Superoxide Generation Using the Spin Trap 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide. *Anal. Biochem.* **247**(2); 404-411. 1997.
123. Samuni, A., Krishna, C.M., Riesz, P., Finkelstein, E., and Russo, A. Superoxide reaction with nitroxide spin-adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **6**(2); 141-148; 1989.
124. Sankuratri, N., Kotake, Y., and Janzen, E.G. Studies on the stability of oxygen radical spin adducts of a new spin trap: 5-Methyl-5-Phenylpyrroline-1-Oxide (MPPO). *Free Radical Biology & Medicine* **21**(6); 889-894; 1996.
125. Sarafian, T.A. and Bredesen, D.E. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic. Res.* **21**(1); 1-8; 1994.
126. Saran, M., Michel, C., and Bors, W. Reaction of NO with O₂⁻. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic. Res. Commun.* **10**(4-5); 221-226; 1990.
127. Schwartz, C.J., Valente, A.J., and Sprague, E.A. A modern view of atherogenesis. *Am. J. Cardiol.* **71**(6); 9B-14B; 1993.
128. Segal, A.W. and Levi, A.J. Cell damage and dye reduction in the quantitative nitroblue tetrazolium (NBT) test. *Clin. Exp. Immunol.* **19**(2); 309-318; 1975.
129. Seitz, R.W. Chemiluminescence detection of enzymically generated peroxide. *Methods of Enzymology* **57**; 445-462; 1978.
130. Seki, H. and Imamura, M. The oxidation of ferrocytochrome c by Br₂⁻, (SCN)₂⁻, N₃ and OH

radicals studied by pulsed-electron and gamma-ray radiolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **635**(1); 81-89; 1981.

131. Seliger, H.H. Excited States and Absolute Calibrations in Bioluminescence. In: Methods in enzymology. Vol. LVII. Academic Press; 560-575; 1978.

132. Skulachev, V.P. [Nonphosphorylating respiration as the mechanism preventing the formation of active forms of oxygen]. *Mol. Biol. Mosk.* **29**(6); 1199-1209; 1995.

133. Storch, J. and Ferber, E. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **169**(2); 262-267; 1988.

134. Suzuki, Y.J., Forman, H.J., and Sevanian, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **22**(1-2); 269-285; 1997.

135. Szabo, C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **21**(6); 855-869; 1996.

136. Szarkowska, L. and Klingenberg, M. On the role of ubiquinone in mitochondria. Spectrophotometric and chemical measurements of its redox reaction. *Biochem. J.* **338**; 674-697; 1963.

137. Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R., and Radi, R. Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**(2); 491-497; 1995.

138. Thorpe, G.H. and Kricka, L.J. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol.* **133**; 331-353; 1986.

139. Totter, J. The quantum yield of the chemiluminescence of dimethylbiacridinium nitrat and the mechanism of its enzymically induced chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* **3**; 231-241; 1964.

140. Toyokuni, S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **20**(4); 553-566; 1996.

141. Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., and Hiai, H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* **358**(1); 1-3; 1995.

142. Turrens, J.F. and McCord, J.M. How relevant is the reoxidation of ferrocytochrome c by hydrogen peroxide when determining superoxide anion production? *FEBS Lett.* **227**(1); 43-46; 1988.

143. Mitochondria. New York, London: Plenum Press; 1982.
144. Udilova, N., Popov, I.N., Levin, G.I., and Vladimirov IuA, [Antioxidant properties of UV-irradiated blood plasma as determined by the photochemiluminescence method]. *Biofizika*. **42**(1); 187-190; 1997.
145. Ueno, I., Kohno, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y., and Kanegasaki, S. Reevaluation of the spin-trapped adduct formed from 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide during the respiratory burst in neutrophils. *J. Biochem. Tokyo*. **105**(6); 905-910; 1989.
146. Valentine, J.S., Miksztal, A.R., and Sawyer, D. Methods for the study of superoxide chemistry in nonaqueous solutions. *Methods of Enzymology* **105**; 71-81; 1984.
147. Valerino, D.M. and McCormack, J.J. Xanthine oxidase-mediated oxidation of epinephrine. *Biochem. Pharmacol.* **20**(1); 47-55; 1971.
148. Vasquez-Vivar, J., Hogg, N., Pritchard, J.K.A., Martasek, P., and Kalyanaraman, B. Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Letters* **403**; 127-130; 1997.
149. Weening, R.S., Wever, R., and Roos, D. Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **85**(2); 245-252; 1975.
150. Winterbourn, C.C. and Sutton, H.C. Iron and xanthine oxidase catalyze formation of an oxidant species distinguishable from OH.: comparison with the Haber-Weiss reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**(1); 27-34; 1986.
151. Wiseman, H. and Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**(Pt 1); 17-29; 1996.
152. Zhao, B.L., Li, X.J., and Xin, W.J. ESR studies on active oxygen radicals produced in the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol. Int. Rep.* **13**(6); 529-536; 1989.

Danksagung.

Meiner Dissertationsbetreuerin, Frau Univ.-Prof. Dr. *Beate Röder*, darf ich für die spontane Zusage der Betreuung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen, für ihre konstruktive wie weiterführende Kritik vielmals danken. Herrn Univ.-Prof. DDr. *Hans Nohl* schulde ich für die unzähligen Anregungen, Hilfestellungen und Ermutigungen und ganz besonders für seine Zuverfügungstellung von Einrichtungen an seinem Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien großen Dank. Meine beiden Lehrer standen in einer für mich wie für das Dissertationsvorhaben in gleicher Weise kritischen Situation mir ganz besonders zur Seite. Ohne sie läge diese Schrift nun nicht vor. Für ihre Unterstützung werde ich ihnen immer ganz besonders dankbar sein.

Meinen Kollegen und Mitarbeitern am Lehrstuhl für Photobiophysik des Institutes für Physik der Humboldt-Universität Berlin sowie am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, besonders *Dr. Lars Gille*, *Dr. Katrin Staniek* und *Dr. Klaus Stolze*, möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung in der experimentellen Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft danken.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit möchte ich mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), bei der Fazit-Stiftung (Frankfurt/Main) sowie bei der Humboldt-Universität zu Berlin für die Gewährung des HEP-Stipendiums bedanken.

Berlin/Wien, September 1998.

Natalia Udilova

Publikationsliste

1. Udilova N. Issledovaniya hemiluminestsentsii lipoproteinov plasmy krovi s tsel'ju diagnostiki arterioskleroza. [Untersuchungen der Lipoproteinchemilumineszenz im Bezug auf Diagnostik der Arteriosklerose]. Diplomarbeit. Moskau, 1992.
2. Udilova N., Popov I.N., Lewin G.I., Vladimirov Yu.A. Antioxidant properties of UV-irradiated blood plasma and its components as determined by method of photochemiluminescence. *Biofizika* 1997;42 (1); 187-190.
3. Udilova N., Lewin G., Popov I. Qualitative and quantitative characterisation of the antioxidant dependent inhibition of photoinduced luminescence of luminol. In: Abstracts of the 2nd International Conference on Clinical Chemiluminescence, Berlin, April 27-30, 1996.
4. Lewin G., Bühring M., Stange R., Landmesser U., Burian A., Udilova N., Popov I. Antioxidant homeostasis and related parameters by fasting patients. Abstracts of 3rd Annual Symposium on Complementary Health Care, Exeter, UK, 11-13 December 1996. *Research in Complementary Medicine* 1996; 3 (6); 319-320.
5. Udilova N., Lewin G., Popov I. Antioxidant effects of the UV blood irradiation in vivo and in vitro. Abstracts of 3rd Annual Symposium on Complementary Health Care, Exeter, UK, 11-13 December 1996. *Research in Complementary Medicine* 1996; 3 (6); 326-327.
6. Udilova N., Staniek K., Nohl H. Critical evaluation on the suitability of existing methods for the detection of O₂⁻ radicals. Abstracts of the 5th Free Radical Research Conference, Gödöllő, Hungary, 25-27 August 1997.
7. Udilova N., Nohl H., Staniek K. Kritische Untersuchungen zur Eignung gängiger Superoxid-Nachweismethoden an biologischen Systemen. Abstracts des 8. Symposiums der deutschsprachigen Veterinärpharmakologen und Toxikologen am 2. Oktober 1998 in Wien.
8. Udilova N. Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium an der Humboldt-Universität zu Berlin. Berlin 1999.
9. Udilova N., Nohl H. The reliability of current detection methods for the evaluation of biological superoxide radical production. Abstracts of 1999 SFRR (Europe) summer meeting. Antioxidants, Adaptation, Aging. Dresden, Germany, July 2-5, 1999.
10. Udilova N., Gille L., Nohl H. Fried oils initiate lipid peroxidation in biomembranes: a possible induction of colon carcinogenesis. Abstracts of 1999 SFRR (Europe) summer meeting. Antioxidants, Adaptation, Aging. Dresden, Germany, July 2-5, 1999.
11. Udilova N., Nohl H. How reliable are existing methods applied for the assessment of biological superoxide production? Abstracts der Gemeinsamen Jahrestagung von ÖBG und ÖGGGT 27.-29. September 1999, Graz, s.57.
12. Udilova N., Gille L., Nohl H. External initiation of biomembrane lipid peroxidation in contact with oxidized fats. Abstracts der Gemeinsamen Jahrestagung von ÖBG und ÖGGGT 27.-29. September 1999, Graz, s. 60.
13. Stolze K., Udilova N., Nohl H. Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO derived spin traps: Detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase. *Free Radic. Biol. Med.* (2000, in press).
14. Stolze K., Udilova N., Nohl H. Spin trapping of lipid radicals using spin traps of different lipophilic properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. to Vol. 361, 2000 (4) p.R164.*
15. Nohl H., Stolze K., Udilova N., Liu Y. Reductant-induced termination of lipid peroxidation in lipid membranes causes singlet oxygen-related chemiluminescence. Abstracts of Dresden Chemiluminescence-Days, Dresden, Germany, 10-13. May 2000, s.31.
16. Stolze K., Udilova N., Nohl H. Lipid radicals: properties and detection by spin trapping. Abstracts of the 5th Symposium „Free Radicals in Biology and Medicine“ 7.-10. June, 2000, in Lodz, Poland, s.84.

17. Stolze K., Udilova N., Nohl H. Lipid radicals: properties and detection by spin trapping. *Acta Biochimica Polonica* (2000, subm.).
18. Udilova N., Gille L., Nohl H. Prooxidant formation from dietary oils and nutritional iron as a mechanism contributing to diet-related colon carcinoma. Abstracts der Gemeinsamen Jahrestagung von ÖBG und ÖGGGT 25.-27. September 2000, Innsbruck.
19. Stolze K., Udilova N., Nohl, H. Iron catalyzed formation of lipid radicals detected by ESR spin trapping. Abstracts der Gemeinsamen Jahrestagung von ÖBG und ÖGGGT 25.-27. September 2000, Innsbruck.
20. Udilova N., Gille L., Nohl H. Dietary oils induce lipid peroxidation of biomembranes: an experimental approach to dietary oil related colon carcinogenesis. *Gastroenterology* (2000, subm.)